

Veterinär-Anatomisches Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Alois Boos)

Arbeit unter der Leitung von
Prof. Dr. H. Augsburg

Immunhistochemische Analyse von Östrogen- und Progesteron-
Rezeptoren in der Urethra von sexuell intakten, ovariectomierten
und Östrogen substituierten ovariectomierten Schafen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Constanze Führer
Tierärztin von Zürich (ZH)

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. H. Augsburg, Referent
PD Dr. I. M. Reichler, Korreferentin

Zürich 2009

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Summary	6
3. Einführung	7
4. Literaturübersicht	
4.1. Anatomie der Harnröhre des weiblichen Schafes	9
4.2. Steroidhormone	10
4.2.1. Östrogene	11
4.2.2. Progesteron	12
4.3. Steroidhormonrezeptoren	12
4.3.1. Steroidhormonrezeptor-Familie	13
4.3.2. Struktur der Steroidhormonrezeptoren	13
4.3.3. Wirkungsmechanismus der Steroidhormonrezeptoren	16
4.3.3.1. Hormonabhängige, nukleäre Aktivierung der Zielzelle	16
4.3.3.2. Hormonunabhängige, nukleäre Aktivierung der Zielzelle	18
4.3.3.3. Steroidhormonrezeptor-unabhängige Aktivierung der Zielzelle	18
4.3.4. Dynamik der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle	19
4.3.4.1. Der nukleozytoplasmatische Transport	19
4.3.4.2. Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle	20
4.4. Vorkommen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren	21
4.4.1. Vorkommen von ER α und ER β in der Urethra	21
4.4.2. Vorkommen von Progesteronrezeptoren in der Urethra	22
4.5. Immunhistochemische Methoden	22
5. Material und Methoden	
5.1. Versuchstiere	24
5.1.1. Vorbehandlung der Versuchstiere	24
5.1.2. Östrogen- und Progesteronbestimmung	25
5.2. Gewinnung und Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	25
5.2.1. Anfertigung der Paraffinschnitte	26
5.3. Immunhistochemie	27
5.3.1. Östrogenrezeptor-Antikörper	27
5.3.2. Progesteronrezeptor-Antikörper	27

5.3.3. Immunhistochemisches Färbeverfahren	28
5.3.4. Kontrollen	29
5.4. Auswertung	29
5.5. Statistik	31
6. Resultate	
6.1. Östradiolwerte	32
6.2. Östrogenrezeptor-Nachweis	33
6.3. Statistische Analyse der Resultate	33
6.3.1. Statistischer Vergleich zwischen den Versuchsgruppen	33
6.3.2. Statistischer Vergleich der Kompartimente	36
6.3.2.1. Gruppenunabhängige statistische Analyse der einzelnen Kompartimente von der gesamten Harnröhre	36
6.3.2.2. Gruppenabhängige statistische Analyse der Kompartimente zwischen den einzelnen Harnröhrenvierteln	36
6.3.2.3. Gruppenabhängige statistische Analyse der Kompartimente in der gesamten Harnröhre	37
6.3.3. Statistischer Vergleich der Harnröhrenviertel	38
6.3.3.1. Statistische Analyse der Harnröhrenviertel zwischen den Versuchsgruppen	38
6.3.3.2. Statistische Analyse der Harnröhrenviertel innerhalb der Versuchsgruppen	40
6.4. Progesteronrezeptor-Nachweis	41
7. Diskussion	
7.1. Methodik	42
7.2. Diskussion der Resultate	43
7.2.1. Östradiolkonzentration und Östrogenrezeptorgehalt	43
7.2.2. Östrogenrezeptor-Nachweis	46
7.2.3. Progesteronrezeptor-Nachweis	48
8. Literaturverzeichnis	50
9. Anhang	
9.1. Immunhistochemische Protokolle	63
9.2. Östradiol- und Progesteronwerte	66
Danksagung	68

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe immunhistochemischer Reaktionen das Vorkommen und die Verteilung von α -Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der Harnröhre sexuell intakter, ovariectomierter und Östrogen substituierter ovariectomierter Merinoschafe zu untersuchen.

In allen untersuchten Kompartimenten (Epithel, Propria, glatte Muskulatur) der einzelnen Harnröhrenviertel konnten α -Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden, wobei in der glatten Muskulatur aller Versuchsgruppen gesamthaft der höchste Rezeptorgehalt auftrat. Dagegen gelang der immunhistochemische Nachweis von Progesteronrezeptoren nicht. Es bestand kein Zusammenhang zwischen den Plasmaöstradiolwerten zum Zeitpunkt der Schlachtung und dem entsprechenden α -Östrogenrezeptorgehalt in den Harnröhrenkompartimenten der 3 Versuchsgruppen. Mittelwertsvergleiche der Rezeptorkonzentration aller Kompartimente der gesamten Harnröhre zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Zwischen aufeinanderfolgenden Harnröhrenvierteln wurden im Allgemeinen in den Kompartimenten aller Versuchsgruppen signifikante Zunahmen des α -Östrogenrezeptorgehaltes von kranial nach kaudal beobachtet. Dieser Befund veranschaulicht, dass die Lokalisation der Probenentnahme in der ovinen Urethra für die Beurteilung und allfällige Vergleiche der Östrogenrezeptorkonzentration von entscheidender Bedeutung ist.

2. Summary

The object of this study was to investigate the presence and distribution of α -estrogen and progesterone receptors in the urethra of sexually intact, ovariectomized and estrogen-substituted ovariectomized Merino sheep, using immunohistochemistry.

Alpha-estrogen receptors were detected in all analyzed compartments (epithelium, lamina propria, smooth muscle layer) of each urethral quarter, whereby the highest receptor concentration was found in the smooth musculature of all groups. In contrast, progesterone receptors could not be identified. No correlation was found between Estradiol plasma concentrations at the time of slaughter and corresponding immunoreactive scores in the urethral compartments of all three groups. No significant difference in the immunoreactivity and distribution of α -estrogen receptors could be ascertained between groups.

Significant increases of estrogen receptor concentrations, however, were generally observed between consecutive urethral quarters from the cranial to the caudal quarter in all three groups. This fact demonstrates that the localisation of the investigated urethral part is crucial for the evaluation or possible comparison of estrogen receptor concentrations.

3. Einführung

Harnblase und Harnröhre bilden eine funktionelle Einheit. Als harnspeichernde bzw. harnableitende Organe sind sie im Wesentlichen für Miktion und Kontinenz verantwortlich. Insbesondere im Zusammenhang mit der Harninkontinenz (Incontinentia urinae) ist die Harnröhre seit einigen Jahren Gegenstand intensiver klinischer, morphologischer und physiologischer Forschungsarbeit.

In zahlreichen Studien konnte bewiesen werden, dass bei der Miktion involvierte Regionen des Gehirns sowie verschiedene Organe des Urogenitalsystems durch Sexualsteroidhormone beeinflusst werden. So konnten zum Beispiel in der Pons des Hirnstammes, in der Harnblase, Harnröhre und in der Beckenbodenmuskulatur der Frau Östrogenrezeptoren lokalisiert werden (Miodrag et al., 1988; Hextall, 2000; Zhu et al., 2004). Zudem werden in der Humanmedizin Zusammenhänge zwischen Veränderungen des weiblichen Sexualhormonstatus und urodynamischen Erkrankungen, wie der häufig postmenopausal auftretenden Harninkontinenz, gesehen. Dem Östrogen werden diverse, mit der Kontinenz in Verbindung stehende Funktionen zugeschrieben. Dazu gehören die Steigerung der Sensibilität der alpha-adrenergen Rezeptoren in der glatten Muskulatur der Urethra, die Stimulation der periurethralen Kollagenproduktion und eine Verbesserung des urethralen Blutflusses (Augsburger und Müller, 2000; Hextall, 2000; Robinson und Cardozo, 2003).

Über das Vorhandensein von Progesteronrezeptoren in der Urethra feminina wurde kontrovers diskutiert. Vermutlich ist der Progesteronrezeptorgehalt in der Harnröhre vom Östrogenstatus abhängig (Batra und Josif, 1987; Blakeman et al., 1996). Progesteron soll in seiner Funktion, vor allem im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Kontinenz, dem Östrogen entgegenwirken (Miodrag et al., 1988).

In der Veterinärmedizin stellt die Incontinentia urinae als Folge der Kastration bei weiblichen Tieren grosser Hunderassen ein gravierendes Problem dar. Bei jeder dritten Hündin mit einem Gewicht über 20 Kilogramm treten, entweder direkt oder innerhalb der folgenden 12 Jahre nach der Ovariectomie, die typischen Symptome einer Harninkontinenz auf. Dank dem Einsatz von α_1 -adrenergen Agonisten kann ein grosser Prozentsatz der betroffenen Hündinnen erfolgreich therapiert werden (Burgherr et al., 2007). Dennoch sind die exakten Zusammenhänge zwischen den pathophysiologischen Vorgängen in der Harnröhre und der Erkrankung bislang weitgehend unbekannt.

Diese Arbeit befasst sich mit dem immunhistochemischen Nachweis und der Quantifizierung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der Urethra weiblicher Merinoschafe. Die Harnröhren stammen von gesamthaft 18 Auen, die zufällig in 3 Versuchsgruppen eingeteilt wurden: sexuell intakt, ovariectomiert sowie Östrogen substituiert ovariectomiert. Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der Urethra der 3 Versuchsgruppen zu vergleichen und einen Zusammenhang zwischen dem Rezeptorgehalt in der Harnröhre und dem Hormonhaushalt zum Zeitpunkt der Schlachtung herzustellen.

In zahlreichen Laboratorien weltweit hat sich das Schaf als beliebtes Modelltier für wissenschaftliche Untersuchungen etabliert. Dies nicht zuletzt wegen seinem genügsamen Wesen, dem problemlosen Handling, den niedrigen Haltungskosten und der besseren Akzeptanz als Versuchstier in der Bevölkerung (Turner, 2002). Humanmedizinisch orientierte Forschungsgruppen setzen besonders gern Auen der Rasse Merino ein, da diese gewisse Ähnlichkeiten zum Zyklusgeschehen der Frau und zu entsprechenden Hormonprofilen aufweisen (Goodman et al., 1994; Newman et al., 1995).

4. Literaturübersicht

Im Folgenden werden die Forschungsergebnisse vorgestellt, die die Grundlage der Untersuchung bilden.

4.1. Anatomie der Harnröhre des weiblichen Schafes

Die Urethra nimmt als harnableitendes Organ im Zusammenhang mit der Kontinenz eine wichtige Rolle ein. Um einem unkontrollierten Harnabsatz entgegenzuwirken sind diverse anatomische Strukturen erforderlich. Dazu gehören die glatte Muskulatur, (welche unter parasymphathischer und adrenerger Alpharezeptorkontrolle steht), der Gefäßplexus als Schwellgewebe, das elastische Bindegewebe sowie der quergestreifte M. urethralis.

Die Harnröhre des weiblichen Schafes, Urethra feminina, ist verglichen mit der des männlichen Schafes relativ kurz und dehnungsfähig. Sie erreicht in der Regel eine Länge zwischen 40 und 50 mm. Der Beginn der Harnröhre (Ostium urethrae internum) ist nicht immer leicht erkennbar. Als morphologisches Kriterium wird diejenige Stelle angegeben, an welcher sich die beiden Plicae uretericae zur unpaaren Crista urethralis vereinigen (Vollmerhaus, 1994).

Die Urethra liegt der Symphysis pelvina auf und verläuft im retroperitonealen Bindegewebe eingebettet bis zum Ostium urethrae externum, das sich unmittelbar kaudal des Hymenalringes schlitzförmig ins Vestibulum vaginae öffnet.

Im Allgemeinen sind im Feinbau an der Urethra von innen nach aussen die Tunica mucosa von der Tunica muscularis und der Tunica adventitia zu unterscheiden. Die Tunica mucosa setzt sich aus der Lamina epithelialis und der Lamina propria zusammen. Die Lamina epithelialis besteht aus einem Übergangsepithel, das im kaudalen Abschnitt der Harnröhre in ein mehrschichtiges Plattenepithel übergeht. Die Lamina propria enthält den kavernenösen Gefäßplexus, der als Schwellkörper funktionieren kann. Die glatte Muskulatur der Tunica muscularis ist hauptsächlich aus zirkulären, aber auch aus Längsfasern aufgebaut. Das Bindegewebe der Tunica adventitia verbindet die Urethra mit ihrer unmittelbaren Umgebung (Augsburger et al., 1993).

4.2. Steroidhormone

Zu den Steroidhormonen gehören Hormone der Gonaden (Sexualsteroidhormone) und der Nebennieren (Corticoide). Sie lassen sich, je nach Anzahl der Kohlenstoffatome, in drei grosse Klassen aufteilen: Progestine (21 C-Atome), Androgene (19 C-Atome), Östrogene (18 C-Atome) (Engelhardt und Breves, 2000).

Sämtliche Steroide können auf ein Steran-Ringsystem (1,2-Cyclopentanoperhydrophenanthren) zurückgeführt werden, das aus vier kondensierten, nichtpolaren Ringen besteht (Penzlin, 2005). Cholesterin, die Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Steroidhormone, wird hauptsächlich in der Leber aus Acetyl-CoA gebildet.

Alle drei Klassen (Progestine, Östrogene, Androgene) können in steroidogenen Zellen des Ovars durch Umwandlung des Cholesterinmoleküls (Hydroxilierung, Methylierung, Entfernung von Seitenketten, Einführung von Doppelbindungen und Ketogruppen) synthetisiert werden. Diese Umwandlungsprozesse werden durch Enzyme ermöglicht, die in den Mitochondrien und im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind.

Der genaue Freisetzungsmechanismus der Hormone ist noch nicht im Detail bekannt. Steroide können jedoch nicht gespeichert werden. Demzufolge findet nach Ablauf der Synthese eine sofortige Freisetzung statt. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften sind die Steroidhormonmoleküle an Serumbindungsproteine gekoppelt und erreichen so über den Blutstrom ihre Zielzellen. Dort passieren sie mittels einfacher Diffusion die Plasmamembran und binden spezifisch an ihren entsprechenden Rezeptor. Die Bindung des Hormons löst eine Konformationsänderung des Rezeptors aus und induziert eine Kaskade von Reaktionen, an deren Ende die Transkriptionsrate des hormongesteuerten Genproduktes erhöht oder verringert wird. Estradiol regt so beispielsweise die Bildung von Ovalbumin und Ovomuroid an, während Progesteron u. a. die Produktion von Avidin und Uteroglobulin induziert (Schütz, 1988).

Um die geeignete Hormonkonzentration im Kreislauf aufrechtzuerhalten, muss neben der Biosynthese auch eine Inaktivierung der Steroide stattfinden. In der Leber wird ihre Wirkung durch Reduktion der Keton-Gruppen und durch Anlagerung von Glucuronsäure aufgehoben. Die dabei entstehenden Metabolite können über den Harn oder den Kot ausgeschieden werden (Döcke, 1994).

4.2.1. Östrogene

Die wichtigsten biologisch aktiven Östrogene sind 17 β -Östradiol (E2), Östron und Östriol. E2 gilt als das potenteste dieser drei Formen, während seine Metabolite (Östron und Östriol) schwächere Agonisten für Östrogenrezeptoren darstellen (Kuiper et al., 1997).

Östrogene nehmen eine Schlüsselposition in der embryonalen Entwicklung, der Aufrechterhaltung der normalen Sexualfunktionen und im Reproduktionsgeschehen ein. Zusätzlich üben sie, bei adulten Individuen beider Geschlechter, einen biologischen Effekt auf das kardiovaskuläre und muskuloskelettale System sowie auf das Immun- und Zentralnervensystem aus (Wierman, 2007). Eine Zusammenstellung der Östrogenwirkung im weiblichen Harntrakt kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1. Auswirkung der Östrogene auf den weiblichen Harntrakt
(modifiziert nach Hextall, 2000; Robinson und Cardozo, 2003)

-
- Verbesserung des urethralen Verschlusses durch:
 - Erhöhung der alpha-adrenergen Rezeptorsensibilität in der glatten Muskulatur der Urethra
 - Vasodilatation und Erhöhung des urethralen Blutflusses
 - Stimulation der periurethralen Kollagenproduktion
 - Erhöhung der Zellmaturation im Harnröhrenepithel

 - Erhöhung des sensiblen Schwellenwertes für die Auslösung der Miktion
 - Verminderung des Auftretens von Harnwegsinfektionen
-

4.2.2. Progesteron

Progesteron ist das wichtigste natürlich vorkommende Progestin. Es agiert als Regulator an verschiedenen Stellen des weiblichen Reproduktionszyklus und nimmt unter anderem bei der Ovulation, der Fertilisation, der Implantation und der Aufrechterhaltung der Trächtigkeit eine zentrale Rolle ein (Graham und Clarke, 1997).

Beobachtungen einer verstärkten Harninkontinenzsymptomatik in progesteron-dominanten Phasen des weiblichen Zyklus (z. B. kurz vor der Menstruation und während der Schwangerschaft) (Hextall et al., 2001) bestätigen, dass dieses Steroidhormon mit dem Krankheitsgeschehen in Verbindung steht. So konnten Miodrag et al. (1988) zeigen, dass Progestin anti-östrogene Eigenschaften gegenüber Muskelzellen aufweist. Zudem antagonisiert Progesteron die östrogen-induzierte Erhöhung des Blutflusses in der Urethra (Batra et al., 1985).

Über andere spezifische Funktionen des Progesterons in der weiblichen Harnröhre ist bis anhin nur wenig bekannt. Man geht heute jedoch davon aus, dass die Progesteronrezeptoren in der Urethra erst ab einer kritischen Östrogenkonzentration im Blut eine entsprechende Affinität gegenüber ihrem homologen Hormon besitzen (Savolainen et al., 2005).

4.3. Steroidhormonrezeptoren

Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Hormonen können Steroide dank ihres lipophilen Charakters frei in das Zellinnere der Zielzelle diffundieren. Spezifische intrazelluläre Bindungsproteine, Rezeptoren, erlauben es den Hormonmolekülen, ihre Botschaft zu vermitteln und ihre Wirkung zu entfalten. Der entscheidende Schritt dabei ist die Aktivierung der Transkription durch Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an den entsprechenden DNA-Abschnitt. Daraufhin setzt sich eine Kaskade von Reaktionen in Gang, die über die Aktivierung bestimmter Gensequenzen zur Transkription, Translation und schliesslich zur Synthese von spezifischen Proteinen führt.

4.3.1. Steroidhormonrezeptor-Familie

Rezeptoren werden nach ihrem Vorkommen im Zytoplasma, im Zellkern und in der Plasmamembran, aber auch anhand ihrer molekularen Struktur oder dem beteiligten Signalübertragungsweg klassifiziert (Engelhardt und Breves, 2000). Steroidhormonrezeptoren werden, gemeinsam mit mehr als 60 anderen Vertretern, aufgrund ihrer Lokalisation zu den nukleären Rezeptoren gezählt (Mangelsdorf et al., 1995).

Die Familie der Steroidhormonrezeptoren stellt die grösste bekannte Familie der nukleären ligandaktivierenden Transkriptionsfaktoren bei Eukaryonten dar. Neben den Rezeptoren für die Steroidhormone Östrogen (ER), Progesteron (PR), Androgen (AR), Gluko (GR)- und Mineralokortikoide (MR) beinhaltet diese Familie Schilddrüsenhormon-Rezeptoren (TR), Vitamin-D-Rezeptoren (VDR), Vitamin-A-Rezeptoren (RAR), Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) und Ecdyson-Rezeptoren (ECR) (Tsai und O'Malley, 1994). Ausserdem gehören, aufgrund ihrer Sequenzhomologien, auch Orphan-Rezeptoren zu dieser Familie, obwohl ihre entsprechenden Liganden und deren Funktion bis anhin noch unbekannt sind.

4.3.2. Struktur der Steroidhormonrezeptoren

Das Wissen um die Struktur der Steroidhormonrezeptoren ist unabdingbar für das genaue Verständnis ihrer Funktionsweise. Molekulares Cloning, Struktur- und Funktionsanalysen ergaben eine Gliederung der nukleären Steroidhormonrezeptoren in sechs Untereinheiten, die als Domänen A bis F bezeichnet werden (Abbildung 1). Im Folgenden wird auf die charakteristischen Unterschiede der einzelnen Domänen eingegangen.

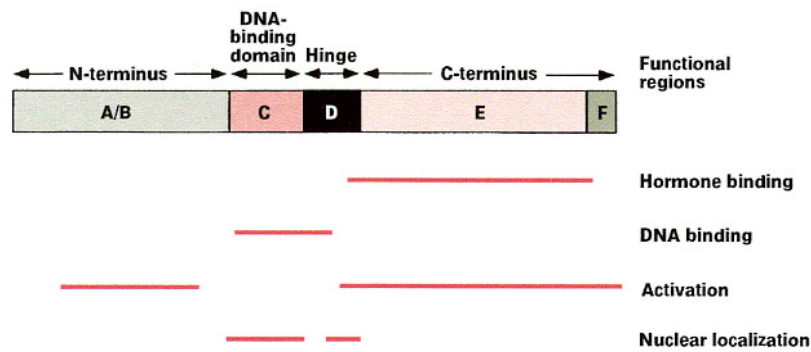


Abb. 1. Die Lokalisation funktioneller Regionen des Steroidhormonrezeptors (Weigel, 1996)

Die N-terminale A/B-Domäne weist eine sehr variable Länge und Aminosäuresequenz auf. Ihr wird eine transkriptionsaktivierende Funktion (TAF-1) zugesprochen. Vermutlich aktiviert sie Zielgene, indem sie mit Komponenten des Transkriptionsmechanismus, Koaktivatoren oder Transaktivatoren in Kontakt tritt (Tsai und O'Malley, 1994). Die N-terminale Region besitzt, verglichen mit anderen Domänen des Rezeptors, die stärkste Antigenität, weshalb in Laboratorien produzierte Antikörper meist gegen Epitope dieser Region gerichtet sind (Gehring et al., 1989).

Die Aminosäuresequenz der C-Domäne ist am stärksten konserviert und dient der Bindung des Rezeptors an die DNA (DNA-bindende Domäne, DBD). Unter den ca. 100 Aminosäuren befinden sich acht Cysteinmoleküle. Von diesen Molekülen binden je vier an das gleiche Zinkion und bilden so die zwei charakteristischen Proteinschlaufen, die für diese Region typischen „Zinkfinger“. Es handelt sich hierbei um α -helikale Windungen, welche die Tertiärstruktur der Domäne stabilisieren (Gehring et al., 1989). Die beiden Zinkfinger werden als voneinander abhängige Subdomänen betrachtet, die sich sowohl strukturell als auch funktionell unterscheiden. Eine kurze Aminosäuresequenz, proximal des aminoterminalen Zinkfingers (P-box), ist für die spezifische DNA-Erkennung verantwortlich und stellt den Kontakt zu bestimmten Basen, den hormonresponsiven Elementen (HRE) her (Beato und Klug, 2000). Die Bindung wird durch nicht-spezifische Interaktionen der zweiten Subdomäne, der distalen D-box des carboxyterminalen Zinkfingers, stabilisiert.

Dieser bindet an die Phosphate des DNA-Rückgrades und dient somit als Kopplungsstelle bei der Zusammenlagerung der aktivierten Rezeptoren zu Dimeren (Kumar und Thompson, 1999).

Zwischen den Domänen C und E befindet sich die sehr variable Hinge- oder D-Region. Sie erlaubt dem Protein, nach Bindung des entsprechenden Liganden (z. B. Östrogen oder Progesteron) im Bereich der ligandbindenden Domäne (LBD), eine Konformationsänderung einzugehen.

Der D-Region schliesst sich die sehr komplexe E-Domäne an, in welcher die LBD zu liegen kommt. Der E-Domäne werden aus diesem Grund vor allem ligandbindende Eigenschaften zugesprochen, womit sie entscheidend als effizienter Aktivator der Transkription mitwirkt (Kumar et al., 1987). Zudem nimmt sie eine Vielzahl anderer Funktionen wahr. So weist die E-Domäne beispielsweise Bindungsstellen für eine Reihe von Hitzeschockproteinen auf und trägt ein Kernlokalisierungssignal.

Nach Dingwal und Laskey (1986) bedienen sich Proteine zweier Mechanismen, um in das Zellkerninnere zu gelangen; entweder diffundieren sie durch die Zellkernmembran in das Zellkerninnere, um anschliessend an intranukleäre Komponenten zu binden, oder die Proteine beherbergen ein Kernlokalisierungssignal, welches direkt über Interaktionen mit Bestandteilen der Kernporen Kontakt zum Nukleus aufnimmt. Progesteronrezeptoren benutzen beide Strategien (Guiochon-Mantel et al., 1989). Bei ihnen nimmt das Kernlokalisierungssignal eine zweite wichtige Funktion im Zusammenhang mit der Aktivierung der DNA-bindenden Region ein (Dingwall und Laskey, 1986).

Die Funktion der variablen F-Domäne am carboxyterminalen Ende wird kontrovers diskutiert. Tsai und O' Malley (1994) messen dieser Region keine spezifische Bedeutung zu. Schon 1987 konnte Kumar et al. nachweisen, dass eine Deletion der F-Region des ER keinerlei Auswirkungen auf bekannte Funktionen des Rezeptors hat. Nach Beato und Klug (2000) besitzt die F-Domäne bei PR, GR und AR, nicht aber bei ER α , ligandbindende Eigenschaften.

4.3.3. Wirkungsmechanismus der Steroidhormonrezeptoren

Die Komplexität des Aktionsmechanismus der Steroidhormonrezeptoren wird anhand der Tatsache deutlich, dass im Verlauf der Zeit unterschiedliche Thesen existierten, welche unterdessen korrigiert, erweitert oder gar wieder verworfen wurden. Bis heute können zahlreiche Fragen noch nicht im Detail beantwortet werden.

Eine Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren kann auf verschiedenen Signalwegen erfolgen. Eine Wirkung in der Zielzelle kann durch hormonabhängige- (Abbildung 2) oder hormonunabhängige, nukleäre Steroidhormonrezeptoren erfolgen. Diesen beiden Wirkungsmechanismen kann die Aktivierung der Zielzellen in Abwesenheit nukleärer Rezeptoren gegenübergestellt werden.

4.3.3.1. Hormonabhängige, nukleäre Aktivierung der Zielzelle

Früher nahm man an, dass in Abwesenheit des Liganden die DNA-bindende Domäne (DBD) durch die ligandbindende Domäne (LBD) blockiert wird. Die Bindung des Liganden induziert eine Strukturveränderung, welche zur Freilegung der DBD führt.

Heute geht man davon aus, dass Steroidhormonrezeptoren in aktiven und inaktiven Formen in der Zelle vorkommen. Im Ruhezustand sind sie an Hitzeschockproteine (Hsp90, Hsp70, Hsp56) gekoppelt (Tsai und O'Malley, 1994; Pratt und Toft, 1997). Eine Interaktion des Steroids mit der inaktiven Form des Rezeptors löst den sogenannten Two-Step-Mechanismus aus (Jensen et al., 1968), welcher zwei aufeinander folgende, klar voneinander unterscheidbare Prozesse beinhaltet. Die Bindung des Hormons im Bereich der LBD führt zunächst zur Ablösung der Hitzeschockproteine (Fliss et al., 2000). In einem zweiten Schritt findet eine Homodimerisierung des Rezeptors und damit eine Transformation von der biologisch inaktiven zur aktiven Form statt (Pratt und Toft, 1997).

Die spezifische Bindungsstelle des Rezeptors an die DNA wird als hormon-responsives Element (HRE) bezeichnet. Mader et al. (1989) konnten drei Aminosäuren in der P-box identifizieren, welche für die Wiedererkennung des HRE der Östrogenrezeptoren (ERE) verantwortlich sind. Das HRE besteht aus zwei seitenverkehrten Wiederholungen (Palindromen), welche durch drei Nukleotide

voneinander getrennt sind. Die Rezeptoren können auch ausserhalb dieser spezifischen Bindungsstellen, allein oder in Verbindung mit anderen Proteinen, mit der DNA in Kontakt treten (Weigel, 1996).

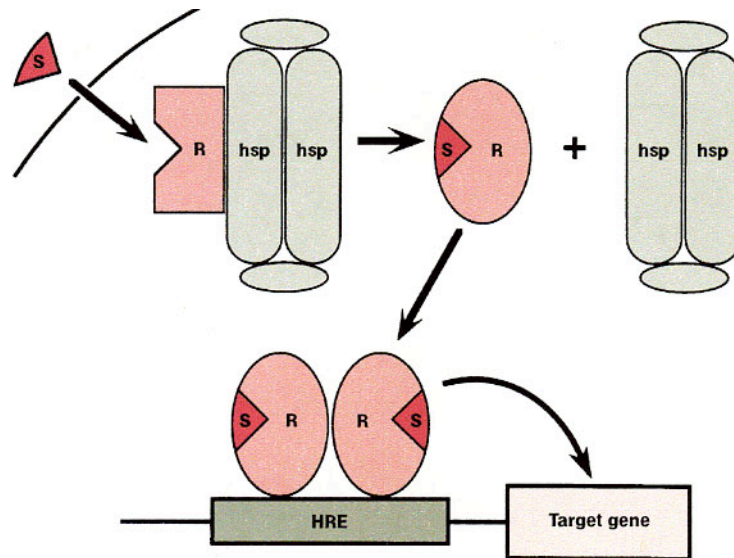


Abb. 2. Aktivierung des Steroidhormonrezeptors (Weigel, 1996). (**S**) Steroid, (**R**) Rezeptor, (**hsp**) Hitzeschockprotein, (**HRE**) hormonresponsives Element

Die Bindung des hormonbesetzten Rezeptordimers an das spezifische HRE führt zur Aktivierung und Intensivierung des Transkriptionsprozesses. Die Transkription wird von zwei Aminosäuresequenzen (TAF-1 bzw. TAF-2) vermittelt, die in der A/B- und am Übergang von der E- zur F-Domäne lokalisiert sind. Während die TAF-2 nur in Abhängigkeit einer Bindung des Hormons an den Rezeptor ihre Funktion wahrnimmt (Kumar et al., 1987), kann die TAF-1-Region als „Haupttranskriptionsaktivator“ auch ligandenunabhängig mit dem Promoter interagieren (Tzuckerman et al., 1994).

Bei der durch nukleäre Rezeptoren regulierten Transkription vermitteln eine Vielzahl von Koaktivatoren, Korepressoren, Mediatoren zwischen dem Steroidhormonrezeptor (SHR) und der Transkriptionsmaschinerie. Ihre Auswirkung auf sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren oder Chromatinfaktoren ist in vielen Fällen schon weit erforscht (Glass und Rosenfelt, 2000; Stenoien et al., 2000; Walters und Nemere, 2004).

4.3.3.2. Hormonunabhängige, nukleäre Aktivierung der Zielzelle

Die überraschende Entdeckung, dass auch in Abwesenheit messbarer Steroidhormonlevel eine Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren stattfinden kann, liess vermuten, dass alternative Signalübertragungswege existieren (Weigel, 1996).

Steroidhormonrezeptoren sind Phosphoproteine. Demnach unterliegt ihre Aktivierung unter anderem der Phosphorylierung. Verschiedene Studien ergaben eine Beteiligung der Phosphorylierung an weiteren Prozessen, zu denen die Beeinflussung der Hormonantwort, die subzelluläre Lokalisation, die DNA-Bindung, DNA-Expression und -Stabilität sowie der Einfluss auf Protein/Protein-Interaktionen gehören.

Steroidhormonrezeptoren und mit ihnen assoziierte Proteine werden an unterschiedlichen, heute in einigen Fällen schon sehr genau bekannten Stellen durch zahlreiche Kinasen phosphoryliert (Weigel und Moore, 2007). Der Aspekt, dass Steroidhormonrezeptoren auch in Abwesenheit ihrer entsprechenden Hormone, beispielsweise durch die Stimulation des Kinasesignalweges, aktiviert werden können, unterstreicht die Wichtigkeit des Phosphorylierungsvorganges im Zusammenhang mit der hormonunabhängigen Steroidhormonrezeptoraktivität (Weigel, 1996).

4.3.3.3. Steroidhormonrezeptor-unabhängige Aktivierung der Zielzelle

Die Suche nach nongenomischen, extranukleären Steroidhormonrezeptoren begann, nachdem beobachtet wurde, dass Hormongaben unerwartet schnell ihre Wirkung entfalten und die biologische Antwort der Zielzelle aufgrund des raschen Ablaufes nicht allein auf eine Genregulation zurückgeführt werden konnte (Walters und Nemere, 2004).

Heute weiss man, dass Steroidhormone auch mit Rezeptoren anderer Zellkompartimente interagieren und ihre Wirkung unabhängig vom Genom, der de-novo-RNA- bzw. Proteinsynthese entfalten können (Fu und Simoncini, 2007). Als Vermittler der Signalübertragung kommen Äquivalente oder Varianten des klassischen, nukleären Rezeptors vor, aber auch Effektorproteine, die keine Parallelen zu klassischen Steroidhormonrezeptoren aufweisen (Wehling et al., 2007).

Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse, dass der Blutspiegel von Steroidhormonen und der Rezeptorgehalt nicht als alleinige Faktoren über den biologischen Effekt entscheiden (Weigel, 1996). Vielmehr führt das Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener, komplexer und häufig eng miteinander verstrickter Prozesse zu einer entsprechenden Antwort der Zielzellen.

4.3.4. Dynamik der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle

Die Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle und ihr dynamischer Transport zwischen den einzelnen Zellkompartimenten sind die wichtigsten Regulationsmechanismen der Transkriptionsaktivität (DeFranco, 2002).

4.3.4.1. Der nukleozytoplasmatische Transport

Der nukleozytoplasmatische Transport der Steroidhormonrezeptoren erfolgt über den Nuclear Pore Complex (NPC), welcher die Doppelmembran des Zellkernmantels penetriert. Der Proteinkomplex, bestehend aus zahlreichen Nukleoporinen, besitzt eine Masse von ca. 120 MDa und gehört damit zu den grössten makromolekularen Bauteilen eukaryontischer Zellen (Weis, 2002).

Der Translokationsmechanismus ist, trotz der erheblichen Grösse des NPC, hoch selektiv und sehr schnell. Während kleine Moleküle passiv durch den NPC diffundieren können, findet ab einer Grösse von 50 bis 60 KDa ein aktiver Transport über Trägerrezeptoren statt (Moore, 1998; Weis, 2002). Die meisten Transportsubstrate passieren den NPC mit Hilfe von Transportrezeptoren der β -Importin-Familie. Einer der wichtigsten Vertreter dieser Familie ist ihr Namensgeber, β -Importin. Der Transport über β -Importin geschieht entweder direkt, über eine Bindung desselben an Nukleoporine des NPC, oder über Adapterproteine (Görlich und Kutay, 1999; Nakielny und Dreyfuss, 1999; Macara, 2001).

Inhibitoren können den zytoplasmatischen Transport von Steroidhormonrezeptoren hemmen oder gar verhindern. Antiöstrogen ICI 182780 unterbricht zum Beispiel die Aufnahme der Östrogenrezeptoren in den Zellkern (Dauvois et al., 1993), was zu einer Akkumulation der Östrogenrezeptoren im Zytoplasma führt.

4.3.4.2. Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle

Die Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Frühere Untersuchungen (Homogenisierung, Fraktionierung, Immunhistochemie) ergaben stark voneinander abweichende Resultate. Dank der Anwendung neuer Methoden, zum Beispiel dem Einsatz von GFP-Chimeren (Green Fluorescent Protein-Chimeras), konnten die dynamischen Ereignisse genauer und übereinstimmend beschrieben werden.

Die Regulation der Genexpression durch Steroidhormonrezeptoren kann dank der strengen subzellulären Kompartimentierung von ligandaktivierten und ungebundenen Rezeptoren erfolgen. Demnach sind prinzipiell alle im Nukleus vorkommenden Steroidhormonrezeptoren an ihren natürlichen Liganden gebunden und somit in den Transkriptionsprozess involviert (Kumar et al., 2006). Dieser Mechanismus kann für Glukokortikoid- (Htun et al., 1996; Galigniana et al., 1999), Thyroid- (Zhu et al., 1998), Vitamin D- (Racz und Barsony, 1999) und Mineralokortikoidrezeptoren (Fejes-Toth et al., 1998) geltend gemacht werden.

Östrogen- und Progesteronrezeptoren hingegen pendeln, auch in Abwesenheit ihrer Liganden, an Hitzeschockproteine gebunden, zwischen den einzelnen Zellkompartimenten, Zytoplasma und Nukleus (Jensen, 1991; Pratt und Toft, 1997; Black et al., 2001; DeFranco, 2002). Immunhistochemische Studien weisen besetzte und unbesetzte Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den meisten Zelltypen praktisch ausschliesslich in den Zellkernen nach. Es konnten nur kleine Rezeptorfraktionen im Zytoplasma gemessen werden (Htun et al., 1999; Lim et al., 1999; Stenoien et al., 2000).

Steroidhormonrezeptoren sind auch in anderen Zellkompartimenten zu finden. So konnten beispielsweise verschiedene Studien die Existenz von GR, ER und TR in den Mitochondrien (Scheller et al., 2003; Yang et al., 2004; Gavrilova-Jordan und Price, 2007) und das Vorkommen von GR (Bartholome et al., 2004), ER (Sebastian et al., 2004), PR (Karthikeyan und Thampan, 1996) und AR (Hatzoglou et al., 2004) in der Plasmamembran nachweisen.

4.4. Vorkommen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind nur in Zielgeweben anzutreffen. Ihre Existenz in einem Organ wird daher als Hinweis für die Affinität des homologen Hormons angesehen. Östrogen- und Progesteronrezeptoren konnten in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Dazu gehören neben dem Urogenitalsystem diverse andere Organsysteme, wie beispielsweise der Verdauungstrakt (Salih et al., 1996), der untere Atmungstrakt (Press und Green, 1988; Saunders et al., 1997; Pelletier, 2000) oder verschiedene Regionen des Zentralnervensystems (Schlenker und Hansen, 2006).

4.4.1. Vorkommen von ER α und ER β in der Urethra

Mit der Entdeckung eines zweiten Östrogenrezeptors (ER β) nahm das Verständnis der Östrogenwirkung eine bedeutende Wende (Kuiper et al., 1996). Beide Rezeptoren besitzen eine physiologische Relevanz und nehmen verschiedene, sich gegenseitig nicht überlappende Funktionen wahr.

ER α und ER β unterscheiden sich in ihrer Struktur nur geringfügig. So konnte in der DNA-bindenden Domäne (DBD) eine Übereinstimmung von 96 % der Aminosäuren festgestellt werden. Dieser Aspekt weist darauf hin, dass beide Rezeptoren mit einer fast gleichen Affinität an östrogenresponsive Elemente (ERE) binden (Gustafsson, 2003). Grössere Strukturunterschiede sind in der ligandbindenden Domäne (LBD) zu finden. Hier besteht lediglich eine Homologie von 53 % der Aminosäuren (Weihua et al., 2003). Aus dieser Diversität ergeben sich unterschiedliche Bindungspräferenzen der physiologisch vorkommenden Östrogene. Eine Ausnahme bildet 17 β -Östradiol (E2), welches eine ähnliche Bindungseigenschaft zu beiden Rezeptorisoformen (ER α und ER β) aufweist (Kuiper et al., 1997).

Dennoch kommt es, infolge eines E2-Kontaktes, nicht nur zu spezifischen, sondern auch zu gegensätzlichen Reaktionen der Zielgewebe. Eine mögliche Erklärung liegt in einer unterschiedlichen Verteilung der beiden Isoformen in den verschiedenen Organen (Peach et al., 1997). Mit Hilfe des Einsatzes von ER α - und ER β -Knockout-Mäusen konnte das E2-Zielgewebe in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

die klassischen, ER α -reichen Organe (Uterus, Plazenta, Milchdrüse, ZNS) und die nicht-klassischen, ER β -reichen Zielgewebe, zu denen unter zahlreichen anderen Organen der Harntrakt gezählt wird (Gustafsson, 1999). Bei männlichen und weiblichen Mäusen konnten Östrogenrezeptoren beider Isotypen mit einer geschlechterspezifischen Verteilung innerhalb der untersuchten Kompartimente der Urethra beschrieben werden (Savolainen et al., 2005).

Auf ein genaues Verteilungsmuster und quantitative Aspekte der Östrogenrezeptoren in der Harnröhre weiblicher Tiere sowie das Vorkommen von Östrogenrezeptoren in Abhängigkeit des Sexualhormonstatus wird in Kapitel 5.2. eingegangen.

4.4.2. Vorkommen von Progesteronrezeptoren in der Urethra

Das Vorkommen von Progesteronrezeptoren im Harntrakt wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Dank dem Einsatz von Östrogenrezeptor-Knockout-Mäusen konnte gesichert werden, dass das Auftreten dieser Rezeptoren in den meisten Geweben eng an den jeweiligen Östrogenstatus – und damit an das Vorkommen von Östrogenrezeptoren – gebunden ist (Vu Hai et al., 1977; Horwitz und McGuire, 1978; Kraus und Katzenellenbogen, 1993). Liegt die Östrogenkonzentration im Blut unter dem kritischen Wert, weist das Gewebe keine oder eine deutlich verringerte Affinität gegenüber Progesteron auf.

Während in der Harnröhre männlicher Mäuse Progesteronrezeptoren gemeinsam mit Östrogenrezeptoren des Isotyps β auftreten, besteht in der weiblichen Harnröhre eine enge Korrelation zum α -Östrogenrezeptor (Savolainen et al., 2005).

4.5. Immunhistochemische Methoden

Unter dem Begriff Immunhistochemie werden eine Reihe gängiger Methoden zur Sichtbarmachung von gewebe- und zellspezifischen Strukturen zusammengefasst. Im Allgemeinen sind dies Verfahren, deren Prinzip auf einer Reaktion zwischen Antigen und Antikörper beruht. Bei der direkten Nachweismethode wird mit spezifischen Antikörpern gearbeitet, die bereits mit einem Markerenzym (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) oder mit Fluorochrom konjugiert sind. Die direkten Methoden sind mit einem geringen zeitlichen Aufwand verbunden. Es müssen jedoch

in der Regel grosse Mengen spezifisch konjugierter Antikörper verwendet werden, weshalb eine starke Hintergrundfärbung entstehen kann. Trotz des hohen Einsatzes von teuren Antikörpern ergeben sich oft nur schwache Farbsignale (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Aus diesem Grund greift man heutzutage auf verschiedene indirekte Methoden zurück. Dabei bindet ein unkonjugierter, spezifischer Primärantikörper an das gewünschte Antigen. Der Antigen/Primärantikörper-Komplex wird im Folgenden mit einem Sekundärantikörper inkubiert, welcher mit einem Markerenzym oder Fluorochrom gekennzeichnet und gegen den speziesspezifischen Primärantikörper gerichtet ist. Im Gegensatz zur direkten Nachweismethode wird mit indirekten Verfahren eine hohe Signalverstärkung erreicht (Boenisch, 2003).

Die StreptABC-Methode (StreptAvidin-Biotin-Komplex) ist eine sehr sensitive indirekte, immunhistochemische Nachweismethode, dies nicht zuletzt wegen der aussergewöhnlich hohen Affinität und Bindungskapazität des Streptavidins zu dem niedermolekularen Vitamin H (Biotin) (Böck, 1989). Avidin/Biotin-Bindungen sind rund eine Million Mal stärker als Antigen/Antikörper-Bindungen.

Neben einem spezifisch gegen das Antigen gerichteten Primärantikörper wird ein sekundärer, biotinylierter Brückenantikörper verwendet. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches sich sehr gut an den Brückenantikörper koppeln lässt und mit einer sogenannten Meerrettichperoxidase gekennzeichnet ist. Bei der dritten Komponente handelt es sich um Streptavidin, einem Protein, das auf gentechnischem Weg hergestellt und aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen wird.

Die Lokalisation der Antigen/Antikörperkomplexe wird mittels dem Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Chromogen wirkt als Elektronendonator und aktiviert die reversibel blockierte Meerrettichperoxidase (Boenisch, 2003). Diese setzt das DAB in ein braunes, unlösliches Farbprodukt um.

5. Material und Methoden

5.1. Versuchstiere

Die untersuchten Harnröhren stammen von Schafen der Rasse Merino. Es handelte sich um 18 gesunde, 5-jährige, nicht-trächtige Auen. Die Tiere wogen, bei gleicher Körpergrösse und einheitlichem Body Condition Score (BCS), durchschnittlich 60 Kilogramm. Die Auen wurden auf Weiden der universitätseigenen Farm (Murdoch University, Western Australia) gehalten und erhielten bei Bedarf zusätzlich Luzerne und Lupine. Keines der eingesetzten Futtermittel (einschliesslich Weidepflanzen) enthielt Phytoöstrogene. Von den 18 Versuchstieren wurden nach dem Zufallsprinzip drei Gruppen zu je 6 Tieren gebildet.

Tabelle 2. Einteilung der Versuchstiere in 3 Versuchsgruppen.

NOC	sexuell intakte Auen
OVX	ovariectomierte Auen
OVE	Östrogen substituierte ovariectomierte Auen

5.1.1. Vorbehandlung der Versuchstiere

Bei 12 zufällig ausgewählten Tieren wurde eine Ovariectomie durchgeführt. Der chirurgische Eingriff erfolgte unter Allgemeinanästhesie (Inhalationsnarkose mit Halothan®). Für die Laparotomie griff man auf eine an der University of Western Australia entwickelte, international anerkannte Methode zurück (Adams et al., 1997). Der chirurgische Zugang wurde in der Linea alba, 5 cm vor der kranialen Begrenzung des Euters gewählt.

Bei der Hälfte der ovariectomierten Auen wurden während der Operation zusätzlich 3 slow-release 17β -Östradiol-Implantate eingesetzt (OVE). Das 1 cm lange und 4,65 mm breite 17β -östradiolgetränkte Silastic-Röhrchen wurde subkutan, im lateralen Bereich des Thorax platziert. Bei dem Implantat handelt es sich um eine von Prof. Greame Martin evaluierte Spezialanfertigung (Martin et al., 1983; Martin et al., 1988).

Jedes Röhrchen entlässt während 24 Stunden 7.5 µg 17β-Östradiol, womit gesamthaft ein Östrogenspiegel entsteht, der in etwa demjenigen der Follikelphase (Proöstrus und Östrus) intakter Auen entspricht. Der Erfolg des Hormonersatzes wurde anhand eines Bioassays (Prüfung des Sexualverhaltens der Tiere) und mittels direkter Östradiol-Messungen (Radioimmunoassay) bestätigt. Die unbehandelte Versuchsgruppe diente als Kontrollgruppe.

5.1.2. Östrogen- und Progesteronbestimmung

Den Versuchstieren der Vergleichsgruppen NOC, OVE und OVX wurde einen Monat nach dem operativen Eingriff aus der Vena jugularis externa Blut entnommen. Es folgten während der gesamten Versuchsphase 2 weitere Blutentnahmen am Ende des 3. und 6. Monats (Tabellen 12–14). Die Bestimmung der Östradiol- und Progesteronkonzentrationen im Plasma erfolgte mittels Radioimmunoassay.

5.2. Gewinnung und Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Die 18 Versuchstiere wurden im Alter von 5 Jahren, 6 Monate nach der Ovariectomie der 12 zufällig ausgewählten Tiere, mit einem Bolzenschuss betäubt und durch Ausbluten getötet.

Harnblase und Harnröhre wurden gemeinsam mit dem Geschlechtsapparat entnommen und in drei Arbeitsschritten von Vagina und Uterus getrennt. Zunächst wurde das Vestibulum vaginae und die Vagina dorsal eröffnet und danach Uterus und Vagina, kranial des Verschmelzungsbereiches von Vagina und Harnröhre, abgesetzt. Die Abtrennung des Vestibulum vaginae erfolgte unmittelbar kaudal der Urethramündung. Schliesslich wurde die Harnblase im Übergangsbereich zur Harnröhre abgesetzt.

Die frisch entnommenen Harnröhren wurden auf einem Zungenspatel befestigt, während 48 Stunden in HistoChoice® (Amresco, Ohio, USA) fixiert und anschliessend routinemässig in Paraffin eingebettet. Die ca. 15 cm langen Paraffinblöcke wurden während 2 Stunden bei einer Temperatur von 60° C in einem Wärmeschrank geschmolzen. Die äusserlich vom Paraffin befreiten Harnröhren

wurden ausgemessen und mit zufälligem Beginn von kranial nach kaudal systematisch in 7.5 mm lange Stücke geschnitten. Dadurch entstanden 4 gleich lange Harnröhrenstücke, die nach ihrer Lokalisation von kranial nach kaudal als HR1/4, HR2/4, HR3/4 und HR4/4 bezeichnet wurden. Die Harnröhrenviertel wurden schliesslich erneut in Paraffin eingebettet.

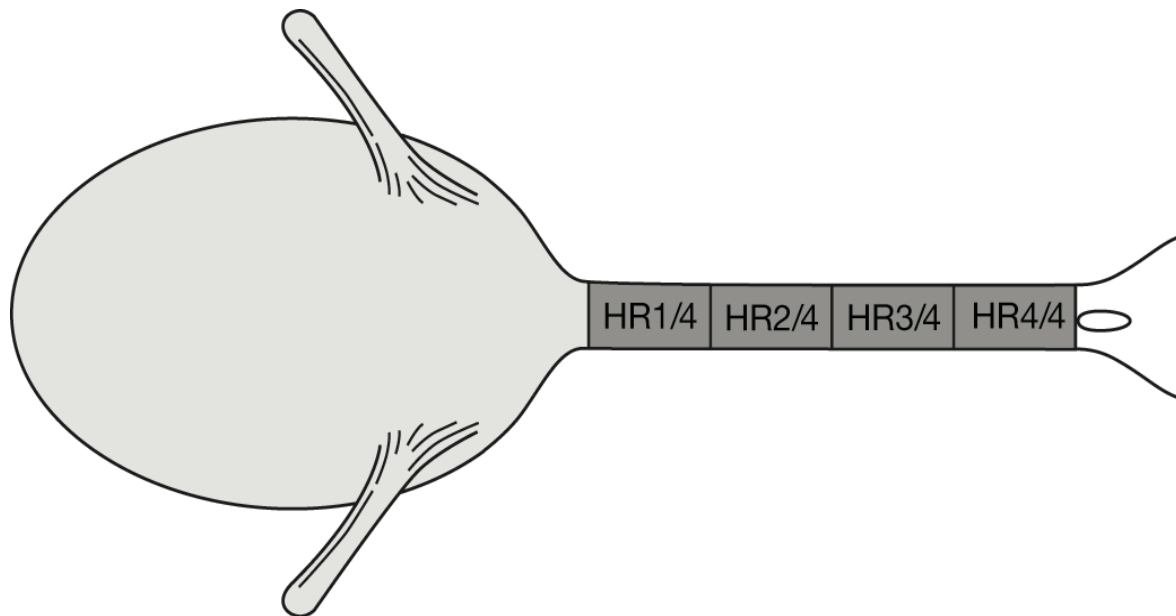


Abb. 3. Schematische Darstellung von Harnröhre und Harnblase. Aufteilung der Harnröhre für die systematische Probenentnahme in die Harnröhrenviertel HR1/4, HR2/4, HR3/4 und HR4/4.

5.2.1. Anfertigung der Paraffinschnitte

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden von jedem Harnröhrenviertel (HR1/4, HR2/4, HR3/4, HR4/4) mit einem Rotationsmikrotom 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, welche anschliessend auf permanent positiv geladene Objektträger (SuperFrostPlus®, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen wurden. Die Trocknung der Schnitte fand bei 37°C während 20 Stunden im Trockenschrank (Memmert, Müller & Krempel, Schweiz) statt.

5.3. Immunhistochemie

In der vorliegenden Untersuchung wurde für den immunhistochemischen Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf die StreptABC-Methode (StreptAvidin-Biotin-Komplex) zurückgegriffen, die sich nicht zuletzt wegen der aussergewöhnlich hohen Affinität und Bindungskapazität des Streptavidins zu dem niedermolekularen Vitamin H (Biotin) in zahlreichen vorangegangenen Studien sehr bewährt hat. Bei der Anwendung dieser Methode soll jedoch daran gedacht werden, allenfalls im Gewebe vorhandenes endogenes Biotin vorgängig zu blockieren, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden.

5.3.1. Östrogenrezeptor-Antikörper

Der eingesetzte Östrogenrezeptor-Antikörper (Anti-ER, 1D5, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) ist ein monoklonaler Antikörper, der durch Immunisierung von Mäusen mit einem rekombinanten Östrogenrezeptor, einem Protein mit einer Molekularmasse von 67 KD, hergestellt wurde. Der Antikörper geht im Bereich der N-terminalen Domäne eine Verbindung mit dem Östrogenrezeptor ein. Anti-ER 1D5 wurde bisher mit Erfolg in verschiedenen humanen Geweben (unter anderem in Geweben des Urogenitaltraktes wie z. B. Niere, Ovar, Prostata) zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. In zahlreichen Vorversuchen konnte seine Kreuzreaktivität mit Östrogenrezeptoren in der ovinen Harnröhre gesichert werden.

5.3.2. Progesteronrezeptor-Antikörper

Der in der Maus hergestellte, monoklonale Progesteronrezeptor-Antikörper Ab-8 (Clone hPRa2+hPRa3) wurde von der Lab Vision Corporation, Fremont, USA für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper bindet im Bereich der N-terminalen Domäne und richtet sich gegen beide Formen des humanen PgR, die 116 kDa (B-Form) und die 81 kDa (A-Form). Laut Angaben des Herstellers besteht zudem eine Kreuzreaktivität des Antikörpers zu den Tierarten Pferd, Schwein und Schaf.

5.3.3. Immunhistochemisches Färbeverfahren

Die immunhistochemischen Reaktionen wurden im Allgemeinen nach den Empfehlungen der Firma DakoCytomation durchgeführt. Für die vorliegende Untersuchung wurden diejenigen Verdünnungen verwendet, die die grösste Intensität der spezifischen Färbung und gleichzeitig die geringsten Hintergrundfärbungen aufwiesen.

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte (Tabelle 8) wurden einer hitze-induzierten Antigendemaskierung unterzogen. Die Präparate wurden dabei in einem Mikrowellenofen während 3 x 5 Minuten bei 103°C und 600 Watt erhitzt, wodurch maskierte Epitope freigelegt und allfällige Proteinvernetzungen aufgehoben wurden. Für den Östrogenrezeptor-Nachweis wurde für den Erhitzungsvorgang eine Antigen-Retrivel-Solution mit pH 9 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), für den Progesteronrezeptor-Nachweis hingegen ein Pro Taqs Citrat-Puffer-Konzentrat mit pH 6 (ProTaqstura, Berlin, Deutschland) verwendet.

Um unspezifische Protein-Protein-Interaktionen auszuschalten und ein möglichst klares Resultat mit minimaler Hintergrundfärbung zu erzielen, wurden nacheinander vier verschiedene Arbeitsschritte getätigt. Die endogenen Peroxidasen wurden durch 10-minütige Inkubation in einer 3% Wasserstoffperoxidlösung geblockt. Unspezifische Bindungen an endogenes Biotin wurden durch die Anwendung eines Avidin/Biotin-Blocking-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verhindert. Zusätzlich wurden die Schnitte während 10 Minuten mit einem serumfreien Proteinblock (DakoCytomation, Zug, Schweiz) und während 20 Minuten mit einem 10% Ziegen-Normalserum (KPL, Maryland, USA) inkubiert.

Nach der Vorbereitung der Schnitte erfolgte die eigentliche immunhistochemische Reaktion. Der in TBS verdünnte Primärantikörper (Verdünnung 1/50) wurde während 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Für die Detektion des Antigen/Antikörper-Komplexes wurde auf die ABC-Methode (StreptABC/ HRP Duet, Mouse/Rabbit, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) zurückgegriffen. Die Sichtbarmachung erfolgte anschliessend mit dem Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB+ Chromogen, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark).

Die Schnitte wurden schliesslich mit Hämalun nach Mayer (Böck, 1989) gegengefärbt (Tabelle 9). Negative Kerne erschienen somit blau und liessen sich bei der

Auswertung sehr gut von positiv reagierenden, braun gefärbten Kernen unterscheiden. Der Kernfärbung schloss sich unmittelbar die aufsteigende Alkoholreihe an. In einem letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte maschinell eingedeckt. In den Tabellen 10 und 11 sind die einzelnen Arbeitsschritte zusammengestellt.

5.3.4. Kontrollen

Zur Sicherung der Qualität sowie zur Überprüfung der Methodik und der verwendeten Reagenzien wurden sowohl Positivkontrollen als auch Negativkontrollen in den jeweiligen Untersuchungen mitgeführt.

Die für den Negativnachweis vorgesehenen Schnitte wurden mit 100 µl des N-Universal Negativ Control (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) während 20 Stunden bei 4° C inkubiert. Dieses Serum besetzt Epitope der N-terminalen Domäne von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, weshalb diese im Folgenden durch das StreptABC-System nicht mehr detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten Schnitte eines ovinen Uterus.

5.4. Auswertung

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden zunächst unter dem Mikroskop (Leica DMLB®) bei einer 20-fachen Vergrößerung beurteilt, wobei vor allem auf die Konstanz der Färbung in den jeweiligen Kompartimenten geachtet wurde.

Für die Auswertung wurden die zu beurteilenden Kompartimente (Epithel, Propria mit Gefäßplexus, glatte Muskulatur) bei einer 400-fachen Vergrößerung digital erfasst (Color View 12, Münster, Deutschland) und die jeweiligen Fotos mit einem Mess- und Orientierungsraster (analySIS®, Soft Imaging System, Münster, Deutschland) versehen. Im Epithel, in der Propria und in der glatten Muskulatur wurden je 500 Zellen aus 3-5 zufällig ausgewählten mikroskopischen Feldern beurteilt und je nach Farbtintensität der Zellkerne in 4 Kategorien eingeteilt: negativ, schwach positiv, mittelstark positiv und stark positiv. Aus der Anzahl ausgezählter Kerne jeder Kategorie wurde der prozentuale Anteil der gesamthaft pro Kompartiment ausgezählten Zellkerne ermittelt. Die Prozentzahl der negativen Zellkerne (SI0=staining intensity 0) wurde mit 0 multipliziert, die schwach positiven Kerne (SI1)

mit 1, die mittelstark positiven Kerne (SI2) mit 4 und schliesslich die stark positiven Kerne (SI3) mit 9. Der immunreaktive Score errechnet sich durch Addition der einzelnen Produkte (Schäubli et al., 2008).

$$\text{ER}\alpha\text{-IRS} = 0 \times n(\text{SI0}) + 1 \times n(\text{SI1}) + 4 \times n(\text{SI2}) + 9 \times n(\text{SI3})$$

Sind nur negative Kerne – und damit keine Rezeptoren vorhanden – ergibt sich ein immunreaktiver Score von 0, während bei maximaler Anfärbung der Zellkerne ein immunreaktiver Score von 900 resultiert. Eine genaue Einteilung der Färbeintensität kann der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3. Immunreaktiver Score (IRS)

IRS	Anfärbung der Zellkerne
0	negativ
0-100	negativ bis schwach positiv
100	schwach positiv
100-400	schwach bis mittelstark positiv
400	mittelstark positiv
400-900	mittelstark bis stark positiv
900	stark positiv

5.5. Statistik

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mit dem Programm StatView 5.1 (SAS Institute Inc, NC, USA) durchgeführt. Die Werte der Plasmahormonkonzentrationen und die semiquantitativen Werte der immunhistochemischen Reaktion folgten einer Normalverteilung. Es wurde durchgehend mit Mittelwerten und Standardabweichungen gerechnet. Zur Anwendung kam die Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, wobei Mittelwerte des Faktors IRS analysiert wurden. Diesen Untersuchungen schloss sich eine Regressionsanalyse an, die Aufschluss über eine mögliche Korrelation zwischen der Plasmahormonkonzentration zum Zeitpunkt der Schlachtung und dem semiquantitativ erfassten immunreaktiven Score (IRS) in der Urethra liefern sollte. Testergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

6. Resultate

6.1. Östradiolwerte

In der Tabelle 4 sind die für die statistische Analyse relevanten Östradiolwerte aufgeführt. Es handelt sich hierbei um die zum Zeitpunkt der Schlachtung mittels Radioimmunoassay bestimmten Plasmaöstradiolkonzentrationen (pg/ml) aller im Versuch involvierten Tiere. Die Auen der Versuchsgruppe NOC und OVE wiesen im Mittel Östradiolwerte von 1.36 pg/ml (NOC) und 1.41 pg/ml (OVE) auf, diejenigen der Gruppe OVX eine mittlere Östradiolkonzentration von 0.64 pg/ml. Bei der ein-faktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur grenzten sich die Gruppen NOC und OVE mit einer starken Tendenz ($p=0.089$) zu höheren Östradiolwerten von der Versuchsgruppe OVX ab.

Die Resultate der Östradiol- und Progesteronmessungen während der gesamten Versuchsphase sind im Anhang in der Tabelle 12 und in den Abbildungen 11 und 12 zu finden.

Tabelle 4. Einzel- und Mittelwerte der Östradiolkonzentrationen (pg/ml) \pm Standardabweichung (SD) der Tiere der Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX zum Zeitpunkt der Schlachtung.

Tiere	pg/ml	Tiere	pg/ml	Tiere	pg/ml
NOC I	0.69	OVE I	0.89	OVX I	0.87
NOC II	1.04	OVE II	1.23	OVX II	0.54
NOC III	1.21	OVE III	1.69	OVX III	0.34
NOC IV	1.13	OVE IV	1.21	OVX IV	0.33
NOC V	0.76	OVE V	1.94	OVX V	0.99
NOC VI	3.31	OVE VI	1.49	OVX VI	0.74
1.36\pm0.98		1.41\pm0.38		0.64\pm0.28	

6.2. Östrogenrezeptor-Nachweis

Östrogenrezeptoren wurden immunhistochemisch in allen Versuchsgruppen (NOC, OVE, OVX) und in den Zellkernen sämtlicher untersuchter Kompartimente (Epithel, Propria, glatte Muskulatur) nachgewiesen. Der quergestreifte M. urethralis wurde nicht in die semiquantitativen Untersuchungen einbezogen, da er nur im kaudalen Bereich der Urethra vorhanden war und seine Zellkerne durchgehend negativ erschienen.

In den Tabellen 5–7 sind die Mittelwerte des Immunreaktiven Score (IRS) sowie die Standardabweichungen (SD) der 3 Versuchsgruppen in den Kompartimenten Epithel, Propria und glatte Muskulatur der Harnröhrenabschnitte HR1/4, HR2/4, HR3/4 und HR4/4 aufgezeigt.

6.3. Statistische Analyse der Resultate

Bei der statistischen Auswertung wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse Vergleiche zwischen den 3 Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX, den Kompartimenten Epithel, Propria und glatte Muskulatur sowie den Harnröhrenvierteln HR1/4–HR4/4 durchgeführt.

Diesem Mittelwertsvergleich schloss sich eine Regressionsanalyse an, bei der die Zusammenhänge zwischen dem Immunreaktiven Score und den Östradiolkonzentrationen im Blutplasma zum Zeitpunkt der Schlachtung näher beleuchtet wurden. Es ergab sich jedoch keine Korrelation zwischen dem ermittelten IRS in den Harnröhrenkompartimenten der Abschnitte HR1/4–HR4/4 bei den 3 Versuchsgruppen und dem Plasmaöstradiolspiegel zum Zeitpunkt der Schlachtung.

6.3.1 Statistischer Vergleich zwischen den Versuchsgruppen

Bei der statistischen Analyse der untersuchten Kompartimente von der gesamten Harnröhre wurden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) in der Reaktionsintensität der Östrogenrezeptoren zwischen den Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX festgestellt (Abbildung 4).

Tabelle 5. Sexuell intakte Auen (NOC) (n=6): Mittelwerte des IRS (\pm SD) in den Kompartimenten Epithel, Propria und glatte Muskulatur der einzelnen Harnröhrenviertel.

NOC	Epithel		Propria		glatte Muskulatur	
HR1/4	53.3	\pm 83.9	143.7	\pm 39.4	317.6	\pm 44.3
HR2/4	192.5	\pm 106.4	174.7	\pm 41.8	222.7	\pm 19.2
HR3/4	329.0	\pm 59.6	236.7	\pm 30.7	183.1	\pm 28.3
HR4/4	424.6	\pm 95.5	307.7	\pm 30.9	192.7	\pm 22.3

Tabelle 6. Östrogen substituierte ovariectomierte Auen (OVE) (n=6): Mittelwerte des IRS (\pm SD) in den Kompartimenten Epithel, Propria und glatte Muskulatur der einzelnen Harnröhrenviertel.

OVE	Epithel		Propria		glatte Muskulatur	
HR1/4	90.1	\pm 43.7	157.1	\pm 31.1	190.0	\pm 23.3
HR2/4	233.9	\pm 85.7	196.9	\pm 21.4	221.5	\pm 34.8
HR3/4	308.6	\pm 66.8	248.4	\pm 35.7	254.4	\pm 34.4
HR4/4	299.4	\pm 52.3	297.0	\pm 30.0	306.3	\pm 40.4

Tabelle 7. Ovariectomierte Auen (OVX) (n=6): Mittelwerte des IRS (\pm SD) in den Kompartimenten Epithel, Propria und glatte Muskulatur der einzelnen Harnröhrenviertel (HR).

OVX	Epithel		Propria		glatte Muskulatur	
HR1/4	33.1	\pm 27.1	136.9	\pm 27.4	303.5	\pm 22.4
HR2/4	123.3	\pm 74.0	189.0	\pm 50.9	284.4	\pm 24.8
HR3/4	239.9	\pm 54.2	269.1	\pm 34.3	266.3	\pm 27.6
HR4/4	280.1	\pm 46.3	296.0	\pm 36.6	245.3	\pm 39.4

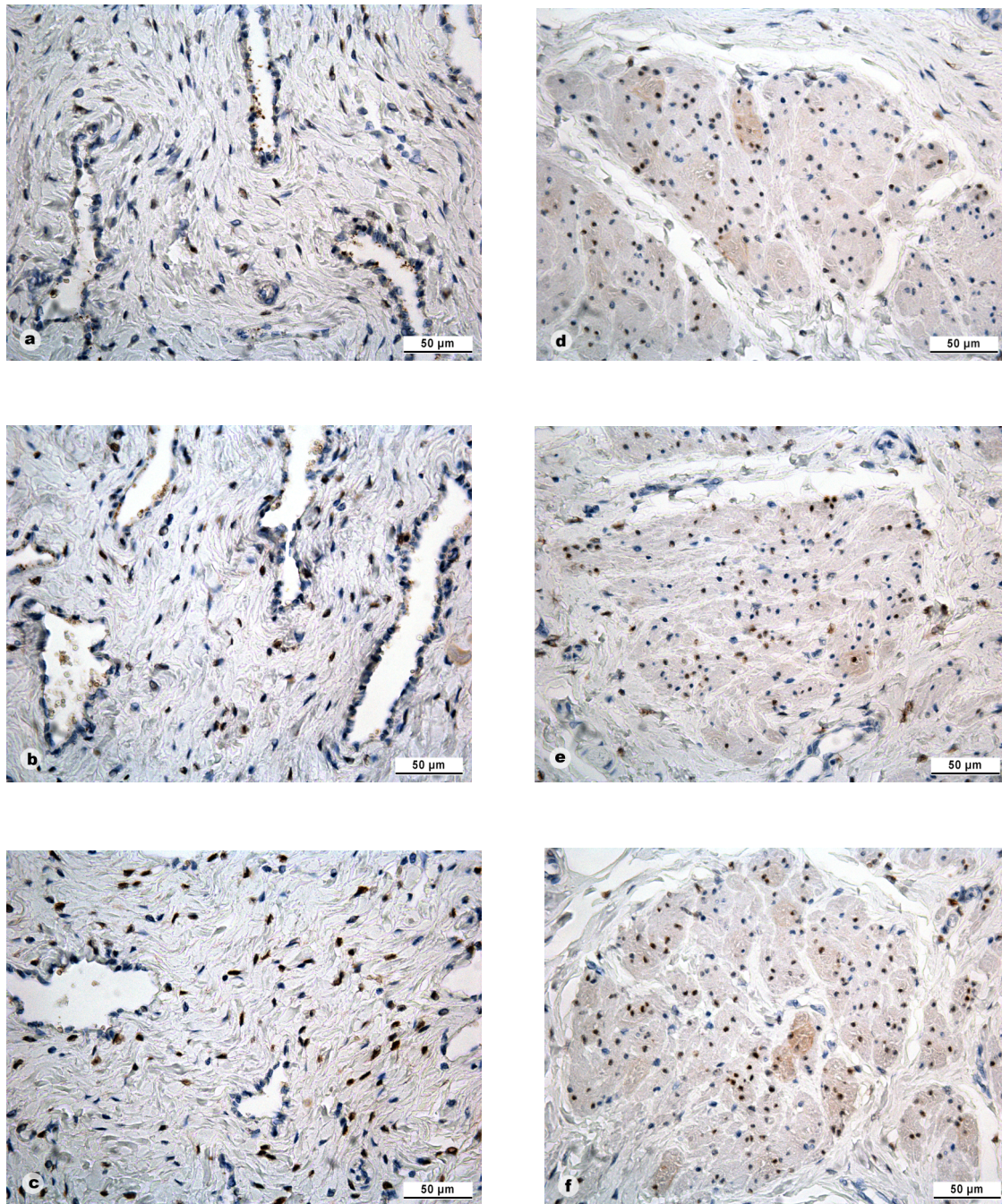


Abb. 4. Immunhistochemische Reaktion der α -Östrogenrezeptoren in der Propria (a,b,c) und der glatten Muskulatur (d,e,f) des HR2/4 von sexuell intakten (NOC), Östrogen substituierten ovariectomierten (OVE) sowie ovariectomierten (OVX) Merinoschafen. Balken, 50 µm
a, d NOC, Propria (**a**) und glatte Muskulatur (**d**); **b, e** OVE;
c, f OVX

6.3.2. Statistischer Vergleich der Kompartimente

6.3.2.1. Gruppenunabhängige statistische Analyse der einzelnen Kompartimente von der gesamten Harnröhre

Da die statistische Analyse der IRS-Mittelwerte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergab, erfolgte die Auswertung der Kompartimente auch gruppenunabhängig. Es wurden die IRS-Mittelwerte der verschiedenen Kompartimente aller Versuchstiere statistisch miteinander verglichen. Auf eine Differenzierung der einzelnen Harnröhrenviertel wurde vorerst verzichtet.

Die Kompartimente Epithel, Propria und glatte Muskulatur wiesen bei der statistischen Analyse im Mittel eine schwache bis mittelstarke Reaktion der Zellkerne auf, wobei in der glatten Muskulatur die stärkste Farbintensität beobachtet wurde. Die statistische Gegenüberstellung der IRS-Mittelwerte von der glatten Muskulatur und den Kompartimenten Epithel sowie Propria lieferte je signifikante Unterschiede ($p < 0.01$), während die Mittelwerte von Epithel und Propria nicht signifikant ($p = 0.66$) differierten.

6.3.2.2. Gruppenunabhängige statistische Analyse der Kompartimente zwischen den einzelnen Harnröhrenvierteln

In einem weiteren Schritt wurden die Kompartimente Epithel, Propria und glatte Muskulatur der Harnröhrenviertel HR1/4-HR4/4 beurteilt. Auch bei dieser statistischen Auswertung wurde nicht zwischen den Versuchsgruppen unterschieden. Die IRS-Mittelwerte des Epithels differierten – mit Ausnahme des Abschnittes HR4/4 – zwischen den einzelnen Harnröhrenvierteln signifikant ($p < 0.001$), wobei die IRS-Mittelwerte von kranial nach kaudal zunahmen. Ähnliches konnte auch in der Propria beobachtet werden, bei der von kranial nach kaudal hochsignifikante Zunahmen ($p < 0.001$) der IRS-Mittelwerte zwischen zwei aufeinanderfolgenden Harnröhrenvierteln resultierten. Mit Ausnahme der Abschnitte HR1/4 und HR3/4 ($p < 0.001$) wiesen die Harnröhrenviertel in der glatten Muskulatur gesamthaft keine signifikanten Unterschiede in der Reaktionsintensität auf (Abbildung 5).

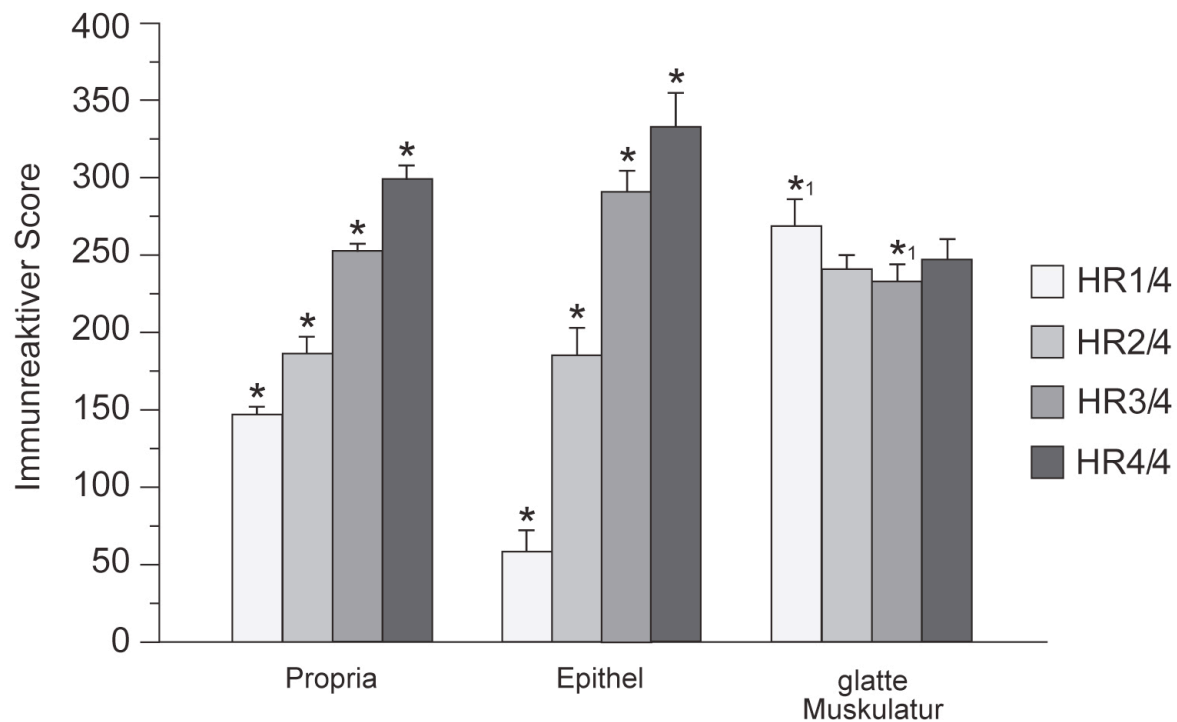


Abb. 5. IRS-Mittelwerte (\pm SD) der Kompartimente Propria, Epithel und glatte Muskulatur in den einzelnen Harnröhrenvierteln (HR1/4–HR4/4) von allen Versuchstieren.

* Statistisch signifikante Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Harnröhrenvierteln innerhalb der Kompartimente ($p < 0.001$).

*₁ Statistisch signifikanter Unterschied zwischen HR1/4 und HR3/4 im Kompartiment glatte Muskulatur ($p < 0.05$)

6.3.2.3. Gruppenabhängige statistische Analyse der Kompartimente von der gesamten Harnröhre

Bei der Versuchsgruppe OVX ergaben sich im Epithel, im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen NOC und OVE, in der gesamten Harnröhre signifikant tiefere Werte ($p < 0.002$). Im Gegensatz zu den Beobachtungen im Epithel wurde in der glatten Muskulatur der Gruppe OVX, im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen, in der gesamten Harnröhre eine signifikant höhere Östrogenrezeptorkonzentration ($p < 0.001$) eruiert. In der Propria differierten die IRS-Mittelwerte der gesamten Harnröhre zwischen den Versuchsgruppen NOC, OVE sowie OVX nicht.

6.3.3. Statistischer Vergleich der Harnröhrenviertel

6.3.3.1. Statistische Analyse der Harnröhrenviertel zwischen den Versuchsgruppen

Bei einer Gegenüberstellung der einzelnen Harnröhrenviertel zwischen den 3 Versuchsgruppen wies der Abschnitt HR4/4 im Epithel der Gruppe NOC, im Vergleich zu denjenigen der Gruppen OVE und OVX, einen signifikant höheren IRS-Mittelwert ($p \leq 0.006$) auf (Abbildung 6). Auch der IRS-Mittelwertsvergleich von der glatten Muskulatur der einzelnen Harnröhrenviertel HR1/4, HR2/4, HR3/4 und HR4/4 zwischen den 3 Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX zeigte statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 7). Bei einer Gegenüberstellung der Harnröhrenabschnitte HR1/4–HR4/4 wurden zwischen den 3 Gruppen in der Propria keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 8).

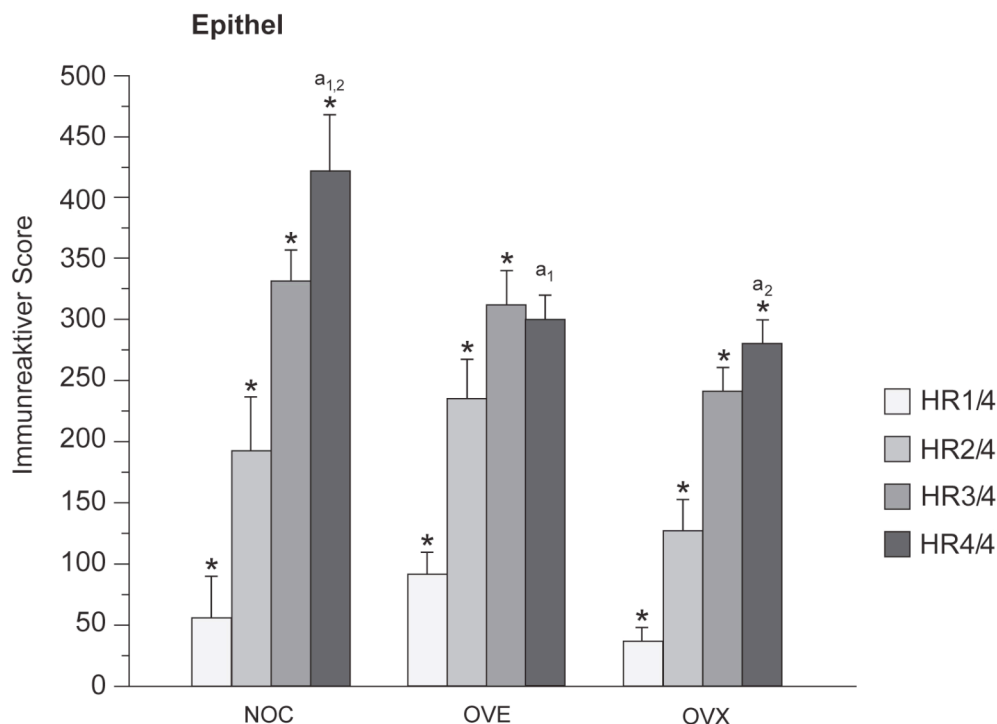


Abb. 6. IRS-Mittelwerte (\pm SD) des Epithels in den Harnröhrenvierteln HR1/4–HR4/4 der Versuchsgruppen NOC, OVE, OVX. *Signifikante Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Harnröhrenvierteln innerhalb der Gruppen ($p < 0.01$). ^{a1,2} Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen OVE und OVX ($p < 0.01$).

Glatte Muskulatur

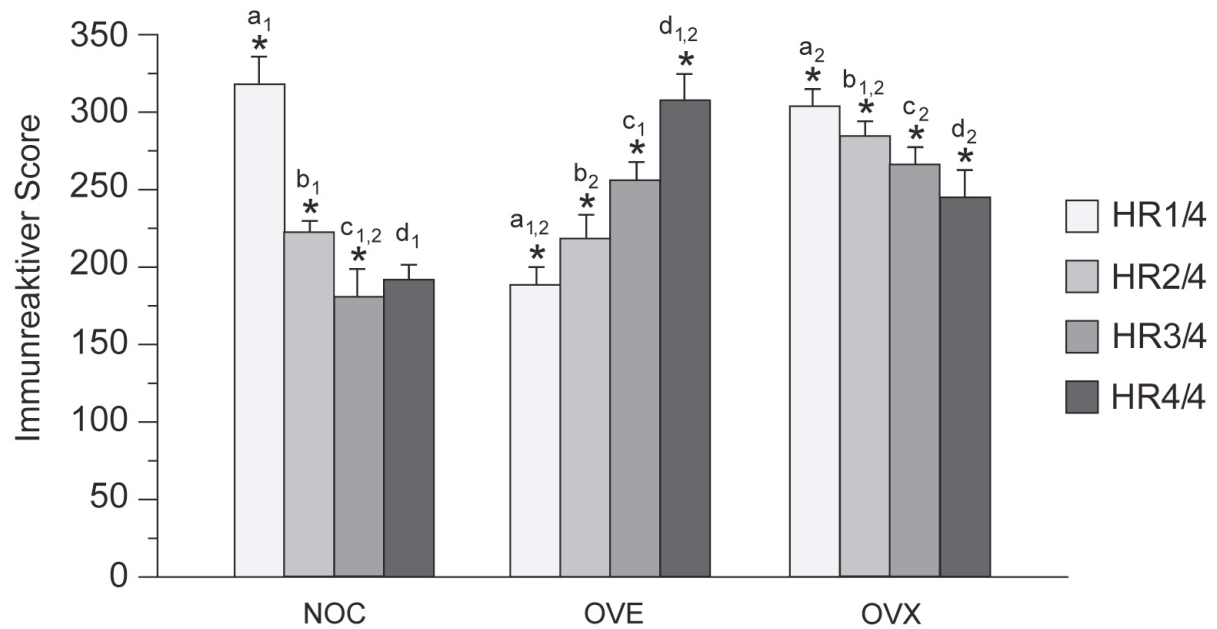


Abb. 7. IRS-Mittelwerte (\pm SD) der glatten Muskulatur in den Harnröhrenvierteln HR1/4–HR4/4 der Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX.

* Statistisch signifikante Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Harnröhrenvierteln innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen ($p < 0.001$).
a_{1,2}-d_{1,2} Signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Harnröhrenvierteln der einzelnen Versuchsgruppe ($p < 0.01$).

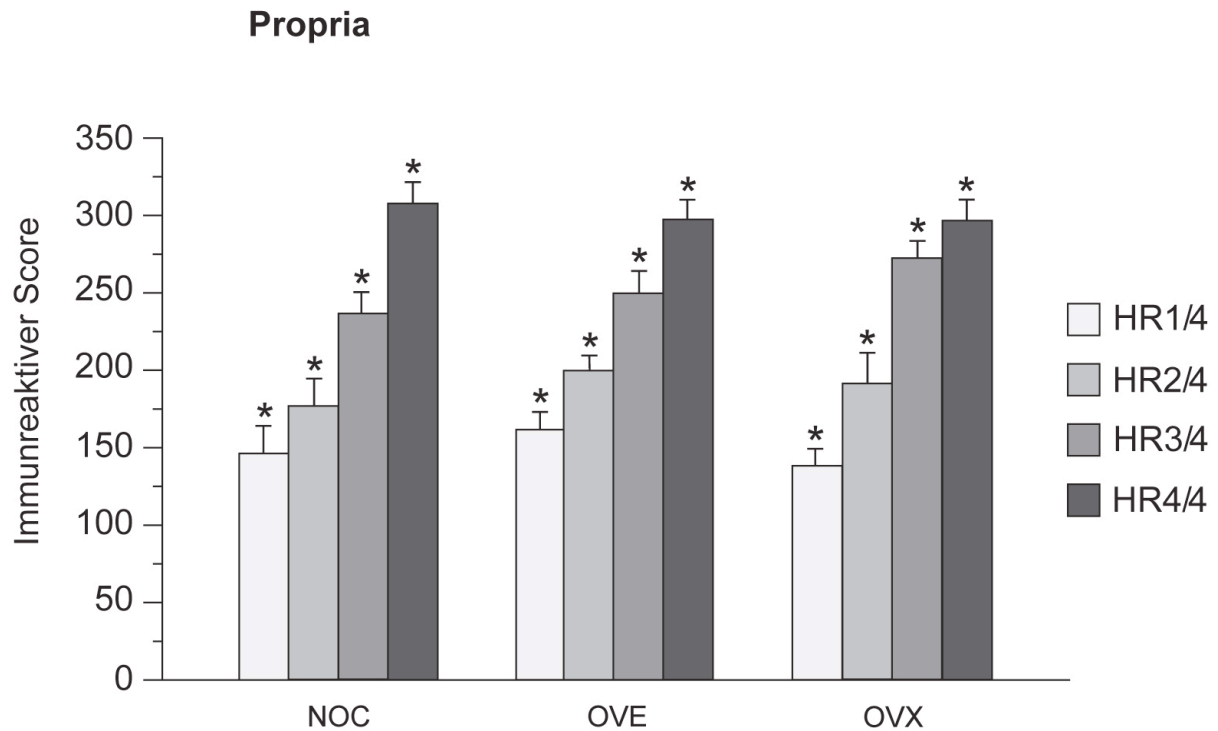


Abb. 8. IRS-Mittelwerte (\pm SD) der Propria in den Harnröhrenvierteln HR1/4–HR4/4 der Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX.

* Statistisch signifikante Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Harnröhrenvierteln innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen ($p < 0.01$).

6.3.3.2. Statistische Analyse der Harnröhrenviertel innerhalb der Versuchsgruppen

Die deutlichsten Unterschiede lieferte der IRS-Mittelwertsvergleich zwischen den einzelnen Harnröhrenabschnitten der verschiedenen Versuchsgruppen (Abbildungen 6,7,8). In den Harnröhrenkompartimenten Epithel und Propria jeder Versuchsgruppe sowie in der glatten Muskulatur der Versuchsgruppe OVE konnten zwischen den Harnröhrenvierteln von kranial nach kaudal signifikante Zunahmen des IRS beobachtet werden ($p < 0.01$). Eine Ausnahme bildeten die IRS-Mittelwerte der glatten Muskulatur von den Versuchsgruppen NOC und OVX. In diesen beiden Gruppen nahm die Reaktionsintensität vom kranialen Harnröhrenviertel (HR1/4) im Vergleich zum dritten Harnröhrenviertel (HR3/4) jeweils signifikant ($p < 0.001$) ab (Abbildung 7).

6.4. Progesteronrezeptor-Nachweis

Der Nachweis von Progesteronrezeptoren in den Harnröhren der Versuchsgruppen NOC, OVX und OVE ergab ausnahmslos negative Resultate. In jedem immunhistochemischen Versuchsablauf wurde als Kontrolle ein histologischer Schnitt des Uterus desselben Merinoschafes mitgeführt. Die Vorbehandlung der Uterusschnitte entsprach exakt derjenigen der Harnröhrenschnitte (Fixationslösung, HistoChoice®, Amresco, Ohio, USA). Auch bei den Uterusschnitten konnten wider Erwarten keine positiven Ergebnisse erzielt werden. In 3 verschiedenen Uteri von Auen der Rasse weisses Alpenschaf hingegen, die zur Überprüfung dieses Sachverhaltes während 24 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet wurden, kam es im selben Versuchsablauf zur positiven immunhistochemischen Färbung in allen Kompartimenten (Abbildung 9).

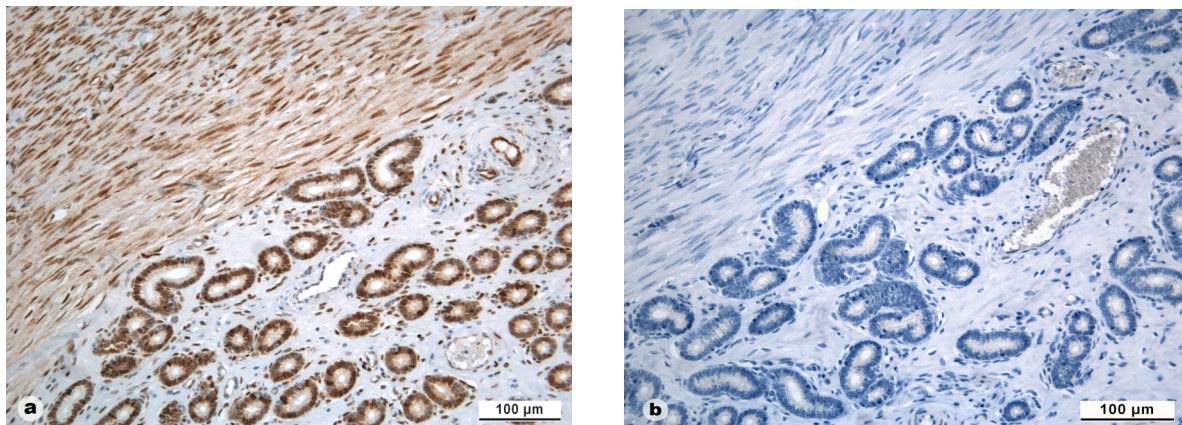


Abb. 9. Immunhistochemische Reaktion der Progesteronrezeptoren im Uterus eines 5-jährigen weissen Alpenschafes.
(a) Positivkontrolle, (b) Negativkontrolle. Balken, 100µm

7. Diskussion

Im Zusammenhang mit der Harninkontinenz (Incontinentia urinae) steht die Urethra seit vielen Jahren im Zentrum umfangreicher klinischer, physiologischer und anatomischer Forschungsarbeit. Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass in Abhängigkeit weiblicher Steroidhormone morphologische und physiologische Veränderungen in der Urethra feminina auftreten (Miodrag et al., 1988; Augsburgsberger und Cruz-Orive, 1995; Augsburgsberger und Cruz-Orive, 1998; Hextall, 2000). Dennoch sind die komplexen Zusammenhänge zwischen den pathophysiologischen Mechanismen und der Inkontinenz bislang nicht geklärt. Nachdem Steroidhormone ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren (Steroidhormonrezeptoren) entfalten, war es Ziel dieser Arbeit, ein exaktes Bild über das Vorkommen und die Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der Urethra von sexuell intakten (NOC), ovariectomierten (OVX) sowie Östrogen substituierten ovariectomierten (OVE) Auen unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Hormonstatus zum Zeitpunkt der Schlachtung zu erhalten.

7.1. Methodik

Vorraussetzung für das Erreichen aussagekräftiger Resultate sind möglichst einheitliche Ausgangsbedingungen. Die an dieser Untersuchung beteiligten Auen gehörten durchgehend der gleichen Rasse an, besaßen dasselbe Alter sowie ein ähnliches Körpergewicht und wurden identisch gefüttert. Neben den homogenen Versuchstiergruppen und den einheitlichen Haltungsbedingungen ist die gewissenhafte Entnahme und Aufarbeitung des Probenmaterials sowie die exakte Einhaltung des immunhistochemischen Untersuchungsprotokolls für die spätere Auswertung der Resultate entscheidend.

Immunhistochemische Reaktionen können automatisch- oder manuell durchgeführt werden. Die Vermutung, dass Automaten zuverlässiger arbeiten und genauere Resultate liefern, bestätigte sich nicht. Bei einer Studie, in der 97% der österreichischen Laboratorien für ER- und PR-Diagnostik involviert waren, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Qualität zwischen automatischen- und manuellen Färbetechniken beobachtet werden (Regitnig et al., 2002). Dank

dieser Kenntnis wurde in vorliegender Untersuchung auf die bereits bewährte, manuelle Methodik zurückgegriffen.

Eine mögliche Fehlerquelle liegt in den z. T. tagesabhängigen Schwankungen der Färbeintensität. Diese konnten jedoch durch die Schaffung einheitlicher Versuchsbedingungen auf ein Minimum reduziert werden. So wurden beispielsweise die bei der statistischen Analyse verglichenen Proben jeweils im selben Arbeitsgang der immunhistochemischen Reaktion unterzogen.

Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Spezifität der für das immunhistochemische Verfahren eingesetzten Antikörper erfolgte in zahlreichen Vorversuchen mittels negativer Kontrollen und dreier, als Positivkontrolle eingesetzter, oviner Uteruspräparate.

7.2. Diskussion der Resultate

7.2.1. Östradiolkonzentration und Östrogenrezeptorgehalt

Ziel der chirurgischen und medikamentellen Vorbehandlung der Auen war es, eine – verglichen mit den sexuell intakten Tieren (NOC) – bedeutend tiefere Plasmaöstradiolkonzentration bei den ovariectomierten Auen (OVX) zu schaffen, und den Östradiolspiegel der Östrogen substituierten ovariectomierten (OVE) Auen demjenigen der Tiere der Gruppe NOC (Follikelphase) anzugleichen. Die mittels Radioimmunoassay zum Zeitpunkt der Schlachtung erhobenen Plasmaöstradiolwerte konnten den Erfolg der Ovariectomie (OVX) und der Östrogensubstitution (OVE) bestätigen und lieferten damit eine wichtige Ausgangsbedingung für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den immunhistochemischen Reaktionen und den jeweiligen Östradiolkonzentrationen zum Zeitpunkt der Schlachtung. Es wurde anfänglich vermutet, dass eine positive Korrelation zwischen dem in der Urethra nachgewiesenen Östrogenrezeptorgehalt und den zum Zeitpunkt der Schlachtung gemessenen Plasmaöstradiolkonzentrationen besteht. Die statistische Auswertung bestätigte diese Hypothese nicht.

Ähnliches beobachteten auch Blakeman et al. (2000) in der Harnröhre der Frau. In ihrer Studie wurden unter anderem Biopsien der Vagina und der Urethra (proximale und distale Abschnitte) von 33 prämenopausalen, 26 postmenopausalen und 31 postmenopausalen Frauen mit Östrogenersatztherapie immunhistochemisch untersucht. In der proximalen und distalen Urethra waren – trotz der sich signifikant unterscheidenden Plasmaöstradiolkonzentrationen der 3 Versuchsgruppen – keine Unterschiede im Östrogenrezeptorgehalt festzustellen. Demgegenüber wurden in der Vagina quantitativ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen eruiert.

Es ist bekannt, dass sich Veränderungen im weiblichen Hormonhaushalt sowohl morphologisch als auch physiologisch auf die Harnröhre auswirken (Hextall, 2000; Blakeman et al., 2001; Robinson und Cardozo, 2003). Die Tatsache, dass Östrogenrezeptoren in der Urethra nachweisbar sind, bestätigt zudem, dass die Harnröhre durch Östrogene beeinflusst wird. Trotzdem ergeben sich keine direkten Korrelationen zwischen dem Östrogenrezeptorgehalt in der Urethra und dem gruppenabhängig variierenden Plasmaöstradiolspiegel, weshalb diese Zusammenhänge differenzierter betrachtet werden müssen.

Wie bereits erwähnt, kommen 2 Isotypen des Östrogenrezeptors ($ER\alpha$ und $ER\beta$) in der weiblichen Harnröhre vor, die trotz ihres geringen Strukturunterschiedes verschiedene physiologische Funktionen besitzen (Weihua et al., 2003). Die weibliche Urethra gehört – anders als z.B. die Vagina – zu den nicht-klassischen und damit $ER\beta$ -reichen 17β -Östradiol-Zielgeweben (Gustafsson, 1999). Aus diesem Grund können sich – obwohl 17β -Östradiol (E_2) ähnliche Bindungseigenschaften zu beiden Isotypen aufweist (Kuiper et al., 1997) – organ- und zellspezifische Reaktionen ergeben, die sich im Allgemeinen von denjenigen des Vaginalgewebes unterscheiden.

Neben dem organspezifischen Verteilungsmuster der Rezeptoren spielt das Hormon 17β -Östradiol selbst eine wichtige Rolle bei der Regulation der Östrogenrezeptor-Expression. So kann eine vorgängige E_2 -Substituierung, in Abhängigkeit des Gewebes, zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Östrogenrezeptor-Expression der Rezeptor-Isoformen $ER\alpha$ und $ER\beta$ führen (Weihua et al., 2003).

Die Komplexität solcher Regulationsmechanismen wird anhand der Tatsache deutlich, dass ER α und ER β nicht nur mit Östrogenen, sondern zusätzlich mit zahlreichen selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) interagieren (Tee et al., 2004).

Ferner können Östrogenrezeptoren verschiedene Funktionen wahrnehmen. Im Nukleus spielen sie eine wichtige Rolle als ligandbindende Transkriptionsfaktoren, während sie ausserhalb des Zellkerns modulierende Einflüsse auf unterschiedliche Signalübertragungsvorgänge ausüben (Edwards, 2005). So können sich unter gegebenen Bedingungen ER α und ER β gegenseitig beeinflussen. Im Zustand mittlerer Plasmahormonspiegel vermag ER β die Transkriptionsaktivität des ER α und gesamthaft die zelluläre Ansprechbarkeit für Östradiol zu senken (Hall und McDonald, 1999).

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass nicht allein die jeweilige Plasmaöstradiolkonzentration über den resultierenden Östrogenrezeptorgehalt in der Urethra bestimmt. Zudem kann nicht aufgrund der Östrogenrezeptorkonzentration der Kompartimente der Urethra auf die tatsächliche Östrogenwirkung in diesem Organ geschlossen werden. Vielmehr dürfte die positive Wirkung des Östrogens im weiblichen Harntrakt (zb. die Verbesserung des urthralen Verschlusses) auf ein Zusammenspiel einer Vielzahl komplexer und eng miteinander verstrickter Prozesse zurückzuführen sein.

7.2.2. Östrogenrezeptor-Nachweis

Bei der statistischen Analyse der untersuchten Kompartimente von der gesamten Harnröhre wurden keine signifikanten Unterschiede in der Reaktionsintensität der Östrogenrezeptoren zwischen den Versuchsgruppen NOC, OVE und OVX festgestellt.

Diese Resultate beziehen sich auf den Nachweis und die semiquantitative Beurteilung des α -Östrogenrezeptors. Wie bereits diskutiert, kommen in der Harnröhre 2 Östrogenrezeptor-Isoformen vor (Savolainen et al., 2005). Es müssten demnach, für die Bestimmung des Östrogenrezeptorgehaltes in der Urethra, beide Isoformen ($ER\alpha$ und $ER\beta$) berücksichtigt werden. Bisherige Erkenntnisse über die Wirkungen der Östrogenrezeptor-Östrogen-Interaktionen in der weiblichen Harnröhre stützen sich auf diejenige des α -Östrogenrezeptors und seine Liganden, während die physiologische Relevanz und genaue Funktionsweise des β -Östrogenrezeptors bis anhin noch nicht bekannt ist (Kuiper et al., 1997). Der Nachweis des β -Östrogenrezeptors gelang trotz der Anwendung dreier verschiedener β -Östrogenrezeptor-Antikörper und verschiedener immunhistochemischer Protokolle in dieser Untersuchung nicht. Die negativen Resultate könnten auf einer fehlenden Kreuzreaktivität der angewendeten Antikörper zu den Rezeptoren in den Geweben des weiblichen Merinoschafes oder dem Fehlen von β -Östrogenrezeptoren im untersuchten Gewebe beruhen.

Savolainen et al. (2005) wiesen in der Urethra der weiblichen Maus α -Östrogenrezeptoren nach und erfassten diese semiquantitativ bei folgenden Gruppen: Wildtyp, ovariectomiert sowie Östrogen substituiert ovariectomiert. Übereinstimmend mit der vorliegenden Studie wurde bei der Maus im Epithel, der Propria und der glatten Muskulatur der Urethra $ER\alpha$ nachgewiesen, während in der quergestreiften Muskulatur keine α -Östrogenrezeptoren vorhanden waren.

In der Studie von Savolainen et al. (2005) wurde in den Harnröhren der ovariectomierten Mäuse im Mittel in den Kompartimenten Epithel und Propria eine schwache Reaktionsintensität ermittelt. Bei der Gruppe der Östrogen substituierten ovariectomierten Tiere kamen im Epithel und in der Propria mittelstark positive Reaktionsintensitäten vor, während bei den weiblichen Wildtypmäusen, abhängig vom

untersuchten Kompartiment, schwache bis stark positive Reaktionen beobachtet wurden.

Rosenzweig et al. (1995) gelang der immunhistochemische Nachweis von Östrogenrezeptoren in den Kompartimenten Epithel, Propria und glatte Muskulatur der proximalen und distalen Urethra von 12 Wochen alten weiblichen Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit. In dieser Studie waren – unabhängig vom Probenentnahmeort (proximal oder distal) – in der Propria nur sehr schwache Östrogenrezeptorkonzentrationen nachzuweisen. Im Epithel und in der glatten Muskulatur wurde in der Studie von Rosenzweig et al. (1995) ein mittelstark bis stark positiver Rezeptorgehalt ermittelt.

In vorliegender Arbeit wurden im Mittel in allen Kompartimenten schwache bis mittelstark positive Östrogenrezeptorkonzentrationen nachgewiesen. Die Ergebnisse decken sich somit in weiten Teilen mit den Resultaten der Studien von Savolainen et al. (2005) und Rosenzweig et al. (1995). Dennoch sind zwischen den 3 Studien einzelne graduelle Unterschiede im Östrogenrezeptorgehalt in den Kompartimenten der verschiedenen Gruppen vorhanden. Diese Unterschiede könnten tierartspezifisch bedingt auftreten oder auf eine unterschiedliche Methodik zurückzuführen sein. In den Studien von Savolainen et al. (2005) und Rosenzweig et al. (1995) kamen vom eigenen Protokoll abweichende immunhistochemische Färbeverfahren zur Anwendung. Zudem wurden bei Rosenzweig et al. (1995) – im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit – nur kleine Ausschnitte (Biopsien) von kranialen und kaudalen Abschnitten der Urethra beurteilt.

Bisher erschienene Östrogenrezeptorstudien der Urethra beschränkten sich häufig auf Biopsien oder fokussierten auf einzelne Stichproben. Die vorliegende Arbeit ermittelte die Östrogenrezeptorkonzentration in den einzelnen Harnröhrenvierteln. Vollständige histologische Querschnitte ermöglichten eine umfassende Beurteilung der Rezeptorverteilung in allen Kompartimenten der 4 Harnröhrenabschnitte.

Der statistische Vergleich des Immunreaktiven Score (IRS) zwischen den einzelnen Harnröhrenvierteln ergab, von 2 Ausnahmen abgesehen, bei allen Versuchsgruppen und Kompartimenten signifikant niedrigere Östrogenrezeptorkonzentrationen in den kranialen Harnröhrenvierteln gegenüber den kaudalen. Die deutlichen Resultate der vorliegenden Studie veranschaulichen, dass sich die Östrogenrezeptorkonzentrationen in den Kompartimenten der 4 Harnröhrenabschnitte deutlich voneinander

abgrenzen. Demnach lässt sich aufgrund einer einzelnen Stichprobe nicht auf die Östrogenrezeptorkonzentration in den Kompartimenten der gesamten Harnröhre schliessen.

Zum gleichen Ergebnis kamen auch Wilson et al. (1984), Strittmatter et al. (1994) und Blakeman (2000), welche ähnliche Untersuchungen mittels biochemischer und immunhistochemischer Methoden an kranialen und kaudalen Harnröhrenbiopsien der Frau durchführten. Es wird angenommen, dass die erhöhte Östrogenrezeptorkonzentration in der kaudalen Urethra mit dem gemeinsamen embryologischen Ursprung (definitiver Urogenitalsinus) dieses Harnröhrenabschnittes und der Vagina in Verbindung gebracht werden kann (Wilson et al., 1984; Strittmatter et al., 1994; Blakeman, 2000).

7.2.3. Progesteronrezeptor-Nachweis

Über das Vorkommen von Progesteronrezeptoren im Harntrakt wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Vermutlich ist die Progesteronrezeptorkonzentration in der Harnröhre vom Östrogenstatus des Individuums abhängig. Verschiedene Autoren wiesen direkte Zusammenhänge zwischen Plasmaöstradiolspiegeln und dem Vorkommen der Progesteronrezeptoren in der Urethra nach (Vu Hai et al., 1977; Horwitz und McGuire, 1978; Batra und Iosif, 1987; Kraus und Katzenellenbogen, 1993). In einer Untersuchung von Blakeman et al. (2000) wurden bei Frauen mit einem erhöhten Plasmaöstrogenspiegel – im Gegensatz zu denjenigen mit normalen oder tieferen Östrogenspiegeln – signifikant höhere Progesteronrezeptorkonzentrationen festgestellt. Lagen die Östrogenkonzentrationen im Blut unterhalb eines kritischen Wertes, wiesen die Rezeptoren in der Harnröhre eine deutlich geringere Affinität gegenüber Progesteron auf.

Savolainen et al. (2005) untersuchten bei Mäusen die geschlechtsspezifische Expression der Progesteronrezeptoren im Harntrakt. In der Harnröhre männlicher Mäuse traten Progesteronrezeptoren gemeinsam mit Östrogenrezeptoren des Isotyps β auf. In der Urethra feminina hingegen bestand eine enge positive Korrelation zum Vorkommen von α -Östrogenrezeptoren. In der Urethra der weiblichen Maus wurden im Epithel, in der Propria und in der glatten Muskulatur Progesteronrezeptoren nachgewiesen, während in der quergestreiften Muskulatur

keine positive Reaktion festzustellen war (Uotinen et al., 1999; Savolainen et al., 2005).

Wie bereits erwähnt, gelang in der vorliegenden Untersuchung der Progesteronrezeptor-Nachweis in der Urethra sowie in den gleich vorbehandelten Uterus-Positivkontrollen (Fixationslösung HistoChoice®) der Merino-Versuchsschafe nicht, obwohl die Reaktionsfähigkeit des verwendeten Antikörpers laut Angaben des Herstellers an ovinen Organen in früheren Studien überprüft und gesichert war. Zur Abklärung dieser Unstimmigkeit wurden histologische Schnitte des weissen Alpenschafes als Positivkontrolle der identischen immunhistologischen Reaktion unterzogen. Die histologischen Schnitte von Uteri des weissen Alpenschafes lieferten deutlich positive Ergebnisse.

Eine fehlende Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers konnte somit als Ursache für den Misserfolg des Progesteronnachweises in der Urethra und dem Uterus der Merino-Versuchsschafe ausgeschlossen werden. Der Rasseunterschied der gegenübergestellten Auen (Merinoschaf und weisses Alpenschaf) wird nicht als möglicher Grund für das unterschiedliche Färbeverhalten in Betracht gezogen, da im Uterus beider Rassen Progesteronrezeptoren erwartet werden können.

Die voneinander abweichenden Ergebnisse dürften auf eine unterschiedliche Fixation der Präparate zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den Uteruspräparaten der Merinoschafe, wurden die Präparate des weissen Alpenschafes vorgängig während 24 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Die Fixation mit Histochoice® könnte das reagierende Epitop des Progesteronrezeptors derart verändert haben, dass eine Demaskierung des Antigens und eine Reaktion mit dem Antikörper nicht möglich war.

8. Literaturverzeichnis

Adams N.R., Briegel J.R., Sanders M.R., Blackberry M.A., Martin G.B. (1997)

Level of nutrition modulates the dynamics of estradiol feedback on plasma FSH in ovariectomized ewes. Anim Reprod Sci 47, 59-70.

Augsburger H.R., Cruz-Orive L.M., Arnold S. (1993)

Morphology and stereology of the female canine urethra correlated with the urethral pressure profile. Acta Anat 148, 197-205.

Augsburger H.R., Cruz-Orive L.M. (1995)

Stereological analysis of the urethra in sexually intact and spayed female dogs. Acta Anat 154, 135-142.

Augsburger H.R., Cruz-Orive L.M. (1998)

Influence of ovariectomy on the canine striated external urethral sphincter (M. urethralis): a stereological analysis of slow and fast twitch fibres. Urol Res 26, 417-422.

Augsburger H.R., Müller U. (2000)

Investigation of the female canine urethral vascular plexus using light and scanning electron microscopy: a contributing factor to urinary continence. Cells Tissues Organs 167, 239-246.

Bartholome B., Spies C.M., Gaber T., Schuchmann S., Berki T., Kunkel D., Bienert M., Radbruch A., Burmester G.R., Lauster R., Scheffold A., Buttgereit F. (2004)

Membran glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J 18, 70-80.

Batra S., Bjellin L., Iosif C.S., Martensson L., Sjögren C. (1985)

Effect of oestrogen and progesterone on the blood flow in the lower urinary tract of the rabbit. Acta Physiol Scand 123, 191.

Batra S.C., Iosif C.S. (1987)

Progesterone receptors in the female lower urinary tract. J Urol 138, 1301-1304.

Beato M., Klug J. (2000)

Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update 3, 225-236.

Black B.E., Holska J.M., Rastinejad F., Paschal B.M. (2001)

DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. Curr Biol 11, 1749-1758.

Blakeman P.J., Hilton P., Bulmer J.N. (1996)

Mapping oestrogen and progesterone receptors throughout the female lower urinary tract. Neurourol Urodyn 15, 324-325.

Blakeman P.J., Hilton P., Bulmer J.N. (2000)

Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. BJU Int 86, 32-38.

Blakeman P. J., Hilton P., Bulmer J.N. (2001)

Cellular proliferation in the female lower urinary tract with reference to oestrogen status. Br J Obstet Gynecol 108, 813-816.

Böck P. (1989)

Romeis Mikroskopische Technik. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München.

Boenisch, T. (2003)

Färbemethoden - Detektionsysteme. In: Boenisch, T.: Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage, DakoCytomation, Hamburg.

Burgherr T., Reichler I.M., Hung L., Hubler M., Arnold S. (2007)

Wirksamkeit, Verträglichkeit und Akzeptanz von Incontex bei Hündinnen mit kastrationsbedingter Harninkontinenz. SAT 7, 291-334.

Dauvois S., White R., Parker M.G. (1993)

The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleoplasmatic shuttling. J Cell Sci 106, 1377-1388.

DeFranco D.B. (2002)

Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. Mol Endocrinol 16, 1449-1455.

Dingwall C., Laskey R.A. (1986)

Protein import into the cell nucleus. Annu Rev Cell Biol 2, 367- 390.

Döcke F. (1994)

Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.

Edwards D.P. (2005)

Regulation of signal transduction pathways by estrogen und progesterone. Annu Rev Physiol 67, 335-376.

Engelhardt W., Breves G. (2000)

Physiologie der Haustiere. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.

Fejes-Toth G., Pearce D., Fejes-Toth N. (1998)

A subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. Proc Natl Acad Sci USA 95, 2973- 2978.

Fliss A.E., Benzeno S., Rao J., Caplan A.J. (2000)

Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. J Steroid Biochem Mol Biol 72, 223-230.

Fu X-D., Simoncini T. (2007)

Non-genomic sex steroid actions in the vascular system. Semin Reprod Med 25, 178-186.

Galagniana MD, Housley P., DeFranco D.B., Pratt W.B. (1999)

Inhibition of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling by okadaic acid requires intact cytoskeleton. J Biol Chem 274, 16222-16227.

Gavrilova-Jordan L.P., Price T. (2007)

Actions of steroids in mitochondria. Semin Reprod Med 25, 154-164.

Gehring U., Helmreich E., Schultz G. (1989)

Molecular mechanisms of hormone action. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 40. Springer-Verlag, Berlin.

Glass C.K., Rosenfeld M. (2000)

The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes Dev 14, 121-141.

Goodman R.L., Knobil E., Neill J.D. (1994)

Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. Physiology of Reproduction, 2nd ed. Raven Press, New York, 659-709.

Görlich D., Kutay U. (1999)

Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu Rev Cell Dev Biol 15, 607-660.

Graham J.D., Clarke C.L. (1997)

Physiological action of progesterone in target tissues. Endocr Rev 18, 502-519.

Guiochon-Mantel A., Loosfelt H., Lescop P., Sar S., Atger M., Perrot-Applanat M., Milgrom E. (1989)

Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. Cell 57, 1147-1154.

Gustafsson J-Å. (1999)

Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol 163, 379-383.

Gustafsson J-Å. (2003)

What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. Trends Pharmacol Sci 24, 479-485.

Hall J.M., McDonald D.P. (1999)

The estrogen receptor β -Isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogen and antiestrogens. Endocrinology 140, 5566-5578.

Hatzoglou A., Kampa M., Kogia C., Charalampopoulos I., Theodoropoulos P.A., Anezinis P., Dambaki C., Papakonstanti E.A., Staphopoulos E.N., Stournaras C. Gravanis A., Castanas E. (2005)

Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. J Clin Endocrinol Metab 90, 893-903.

Hextall A. (2000)

Oestrogens and lower urinary tract function. Maturitas 36, 83-92.

Hextall A., Bidmead J., Cardozo L., Hooper R. (2001)

The impact of the menstrual cycle on urinary symptoms and the result of urodynamic investigation. Br J Obstet Gynecol 108, 1193-1196.

Horwitz K.B., McGuire W.L. (1978)

Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. J Biol Chem 253, 2223-2228.

Htun H., Barsony J., Renyi I., Gould D.L., Hager G.L. (1996)

Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. Proc Natl Acad Sci USA 93, 4845-4850.

Htun H., Holth L.T., Walker L.T., Davie D., Hager G.L. (1999)

Direct visualization of the human estrogen receptor α reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 10, 471-486.

Jensen E.V. (1991)

Steroid hormone receptors. *Curr Top Pathol* 83, 365-431.

Jensen E.V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf W.E., Jungblut P.W., DeSombre E.R. (1968)

A two-step mechanism for interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 59, 632-638.

Karthikeyan N., Thampan R. (1996)

Plasma membrane is the primary site of localization of the nonactivated estrogen receptor in the goat uterus: hormone binding causes receptor internalization. *Arch Biochem Biophys* 325, 47-57.

Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S. (1993)

Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132, 2371-2379.

Kuiper G.G.J.M., Carlsson B.O., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J-Å. (1997)

Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor α and β . *Endocrinology* 138, 863-870.

Kuiper G.G.J.M., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S. & Gustafsson J-Å. (1996)

Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5925-5930.

Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.R., Chambon P. (1987)

Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-51.

Kumar R., Thompson E.B. (1999)

The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319.

Kumar S., Saradhi M., Chaturvedi N.K., Tyagi R.K. (2006)

Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 246, 147-156.

Lim C.S., Baumann C.T., Htun H., Xian W., Irie M., Smith C.L., Hager G.L. (1999)

Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol* 13, 366-375.

Macara I.G. (2001)

Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 570-594.

Mader S., Kumar V., de Verneuille H., Chambon P. (1989)

Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338, 271-274.

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M. et al. (1995)

Overview: the nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

Martin G.B., Scaramuzzi R.J., Henstridge R.J. & J.D. (1983)

Effects of oestradiol, progesterone and androstenedione on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes during spring and autumn. *J Endocrinol* 96, 181-193.

Martin G.B., Price C.A., Thiéry J.C., Webb R. (1988)

Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J Reprod Fertil* 82, 319-328.

Miodrag A., Castleden C.M., Vallance T.R. (1988)

Sex hormones and the female urinary tract. *Drugs* 36, 491-504.

Moore M.S. (1998)

Ran and nuclear transport. J Biol Chem 273, 22857-22860.

Nakielnny S., Dreyfuss G. (1999)

Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. Cell 99, 677-690.

Newman E., Turner A.S., Wark J.D. (1995)

The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. Bone 16, 277-284

Noll S., Schaub-Kuhnen S. (2000)

Praxis der Immunhistochemie. Urban & Fischer, München-Jena.

Peach K., Webb P., Kuiper G.G.J.M., Nilsson S., Gustafsson J-Å., Kushner P.J., Scanlan T.S. (1997)

Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. Science 277, 1508-1510.

Pelletier G. (2000)

Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. Histol Histopathol 15, 1261-1270.

Penzlin H. (2005)

Lehrbuch der Tierphysiologie. 7. Auflage, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.

Pratt W.B., Toft D.O. (1997)

Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr Rev 18, 306-360.

Press M.F., Green G.L. (1988)

Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. Endocrinology 122, 1165-1175.

Racz A., Barsony J. (1999)

Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. J Biol Chem 274, 19352-19360.

Regitnig P., Reiner A., Dinges H-P., Höfler G., Müller-Holzner E., Lax S.F., Obrist P., Rudas M., Quehenberger F. (2002)

Quality assurance for detection of estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in Austrian pathology laboratories. Virchows Arch 441, 328-334.

Robinson D., Cardozo L.D. (2003)

The role of estrogens in the female lower urinary tract dysfunction. Urology 62, 45-51.

Rosenzweig B.A., Bolina P.S., Birch L., Moran C., Marcovici I., Prins G.S. (1995)

Location and concentration of estrogen, progesterone, and androgen receptors in the bladder and urethra of the rabbit. Neurourol Urodyn 14, 87-96.

Salih M.A., Sims H.S., Kalu D.N. (1996)

Putative intestinal estrogen receptor: evidence for regional differences. Mol Cell Endocrinol 121, 47-55.

Saunders P.T.K., Maguire S.M., Gaughan J., Millar M.R. (1997)

Expression of oestrogen receptor beta (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. J Endocrinol 154, R13-R16.

Savolainen S., Santti R., Streng T., Gustaffson J-Å., Härkönen P., Mäkelä S. (2005)

Sex specific expression of progesterone receptor in mouse lower urinary tract. Mol Cell Endocrinol 230, 17-21.

Schäubli M., Ritter N., Hässig M., Zerbe H., Bleul U., Boos A. (2008)

Progesterone receptors, oestrogen receptor α and glucocorticoid receptors in the bovine intercaruncular uterine wall around parturition. Anim Reprod Sci 103, 215-227.

Scheller K., Seibel P., Sekerist C.E. (2003)

Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. Int Rev Cytol 222, 1-61.

Schütz G. (1988)

Control of gene expression by steroid hormones. Biol Chem Hoppe-Seyler 369, 77-86.

Sebastian T., Sreeja S., Thampan R.V. (2004)

Import and export of nuclear proteins: focus on the nucleocytoplasmic movements of two different species of mammalian estrogen receptor. Mol Cell Biochem 260, 91-102.

Stenoien D.L., Mancini M.G., Patel K., Allegretto E.A., Smith C., Mancini M.A. (2000)

Subnuclear trafficking of estrogen receptor- α and steroid receptor coactivator-1. Mol Endocrinol 14, 518-534.

Strittmatter H.-J., Wischnik A., Pollow K., Weigel M., Voges G., Melchert F. (1994)

Steroid hormone receptors in the female urogenital tract. Int Urogynecol J 5, 146-153.

Tee M.K., Rogatzky I., Tzagarakis-Foster C., Cvorc A., An J., Christy R.J., Yamamoto K.R., Leitman D.C. (2004)

Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors α and β . Mol Biol Cell 15, 1262-1272.

Tsai M-J., O' Malley B.W. (1994)

Molecular mechanisms of action of steroid/ thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-486.

Turner A.S. (2002)

The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Vet J* 163, 232-239.

Tzuckerman M.T., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M.G., Stein R.B., Pike J.W., McDonnell D.P. (1994)

Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8, 21-30.

Uotinen N., Puustinen R., Pasanen S., Manninen T., Kivineva M., Syväälä H., Tuohimaa P., Ylikomi T. (1999)

Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. *Gen Comp Endocrinol* 115, 429-441.

Vollmerhaus B. (1994)

Harnapparat. In: *Anatomie von Hund und Katze*. Hsrg. J. Frewein, B. Vollmerhaus. Blackwell-Wissenschaft, Berlin.

Vu Hai M.T., Warembourg M., Milgrom E. (1977)

Hormonal control of progesterone receptors. *Ann NY Acad Sci* 11, 199-209.

Walters M.R., Nemere I. (2004)

Receptors for steroid hormones: membrane- associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci* 61, 2309-2321.

Wehling M., Schultz A., Lösel R. (2007)

To be or not to be (a receptor). *Steroids* 72, 107-110.

Weigel N.L. (1996)

Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319, 657-667.

Weigel N.L., Moore N.L. (2007)

Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *Nucl Recept Signal* 5, 1-13.

Weihua Z., Andersson S., Cheng G., Simpson E.R., Warner M., Gustafsson J-Å. (2003)

Update on estrogen signaling. *FEBS Letters* 546, 17-24.

Weis K. (2002)

Nucleocytoplasmatic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* 14, 328-335.

Wierman M.E. (2007)

Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Educ* 31, 26-33.

Wilson P.D., Barker G., Barnard R.J., Siddle N.C. (1984)

Steroid hormone receptors in the female lower urinary tract. *Urol Int* 39, 5-8.

Wolf H., Wandt H., Jonat W. (1991)

Immunohistochemical evidence of estrogen and progesterone receptors in the female lower urinary tract and comparison with the vagina. *Gynecol Obstet Invest* 32, 227-231.

Yang S.H., Liu R., Perez E.J., Wen Y., Stevens J.R.S.M., Valencia T., Brun-Zinkernagel A.M., Prokai L., Will Y., Dykens J., Koulen P., Simpkins J.W. (2004)

Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4130-4135.

Zhu L., Lang J., Feng R., Chen J., Wong F. (2004)

Estrogen receptor in pelvic floor tissues in patients with stress urinary incontinence.
Int Urogynecol J 15, 340-343.

Zhu X.G., Hanover J.A., Hager G.L., Cheng S.Y. (1998)

Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. J Biol Chem 273, 27058-27063.

9. Anhang

9.1. Immunhistochemische Protokolle

Die aufgeführten immunhistochemischen Protokolle sind in ihrem Aufbau prinzipiell identisch. Die entstandenen Abweichungen sind auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten der verwendeten Antikörper zurückzuführen.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung sowie die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer wurde bei allen Nachweisen identisch und gemäss den Protokollen in Tabellen 12 und 13 vorgenommen.

Tabelle 8. Entparaffinieren und Rehydrieren.

Zeit	Arbeitsgang
10 Minuten	Xylol I
10 Minuten	Xylol II
10 Minuten	Xylol III
5 Minuten	100 % Alkohol
5 Minuten	100 % Alkohol
5 Minuten	96 % Alkohol
5 Minuten	70 % Alkohol
5 Minuten	Aqua bidest.

Tabelle 9. Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer.

Zeit	Arbeitsgang
2 Sekunden	70 % Alkohol
2 Sekunden	96 % Alkohol
2 Minuten	100 % Alkohol
5 Minuten	Xylol

Tabelle 10. Östrogenrezeptor-Nachweis
Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor (ER)
Clone: 1D5, DakoCytomation

Zeit	Arbeitsgang
	Entparaffinierung/Rehydrierung gemäss Tabelle 12
3x5 Minuten	Demaskierung in Antigen Retrieval-Puffer pH 9 bei 103° C in Mikrowelle (600 W)
20 Minuten	Abkühlen in kaltem Wasserbecken
10 Minuten	3% H ₂ O ₂ in Aqua bidest.
5 Minuten	Spülen in TBS
20 Minuten	Inkubation mit Avidin D-Blockierungslösung Blocking Kit, Vector Laboratories, SP-2001
5 Minuten	Spülen in TBS
20 Minuten	Inkubation mit Biotin-Blockierungslösung Blocking Kit, Vector Laboratories, SP- 2001
5 Minuten	Spülen mit TBS
20 Minuten	Inkubation mit 1% NtgS-TBS, 100 µl NtgS und 900 µl TBS
5 Minuten	Spülen mit TBS
10 Minuten	Protein-Block Serum-free, DakoCytomation
20 Stunden	Inkubation mit dem Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen-Receptor, Verdünnung 1/50, bei 4° C Negativkontrolle: N-Universal, Mouse Negativ Control, DakoCytomation,
5 Minuten	Spülen mit TBS
2x30 Minuten	Inkubation StreptABComplex/HRP, DakoCytomation A und B 15 Minuten vor Gebrauch vorbereiten
5 Minuten	Inkubation mit DAB
5 Minuten	Spülen mit TBS
15 Sekunden	Kernfärbung
10 Minuten	Bläuen unter fliessendem Wasser
	Kernfärbung gemäss Tabelle 13 Eindecken mit Pertex®

Tabelle 11. Progesteronrezeptor-Nachweis
Monoclonal Mouse Progesterone Receptor Ab-8
Clone: hPRa2+hPRa3, Lab Vision Corporation

Zeit	Arbeitsgang
	Entparaffinierung/Rehydrierung gemäss Tabelle 12
3x5 Minuten	Demaskierung in Citratpuffer pH 6 bei 103° C in Mikrowelle (600 W)
20 Minuten	Abkühlen in kaltem Wasserbecken
10 Minuten	3% H ₂ O ₂ in Aqua bidest.
5 Minuten	Spülen in TBS
20 Minuten	Inkubation mit Avidin D-Blockierungslösung Blocking Kit, Vector Laboratories, SP-2001
5 Minuten	Spülen in TBS
20 Minuten	Inkubation mit Biotin-Blockierungslösung Blocking Kit, Vector Laboratories, SP- 2001
5 Minuten	Spülen mit TBS
20 Minuten	Inkubation mit 1% NtgS-TBS 100 µl NtgS und 900 µl TBS
5 Minuten	Spülen mit TBS
10 Minuten	Protein-Block Serum-free, DakoCytomation
20 Stunden	Inkubation mit dem Monoclonal Mouse Progesterone Receptor Ab-8, Verdünnung 1/50, bei 4° C Negativkontrolle: N-Universal, Mouse Negativ Control, DakoCytomation
5 Minuten	Spülen mit TBS
2x30 Minuten	Inkubation StreptABComplex/HRP, DakoCytomation A und B 15 Minuten vor Gebrauch vorbereiten
5 Minuten	Inkubation mit DAB
5 Minuten	Spülen mit TBS
15 Sekunden	Kernfärbung
10 Minuten	Bläuen unter fliessendem Wasser
	Kernfärbung gemäss Tabelle 13 Eindecken mit Pertex®

9.2. Resultate der Östradiol- und Progesteronbestimmung

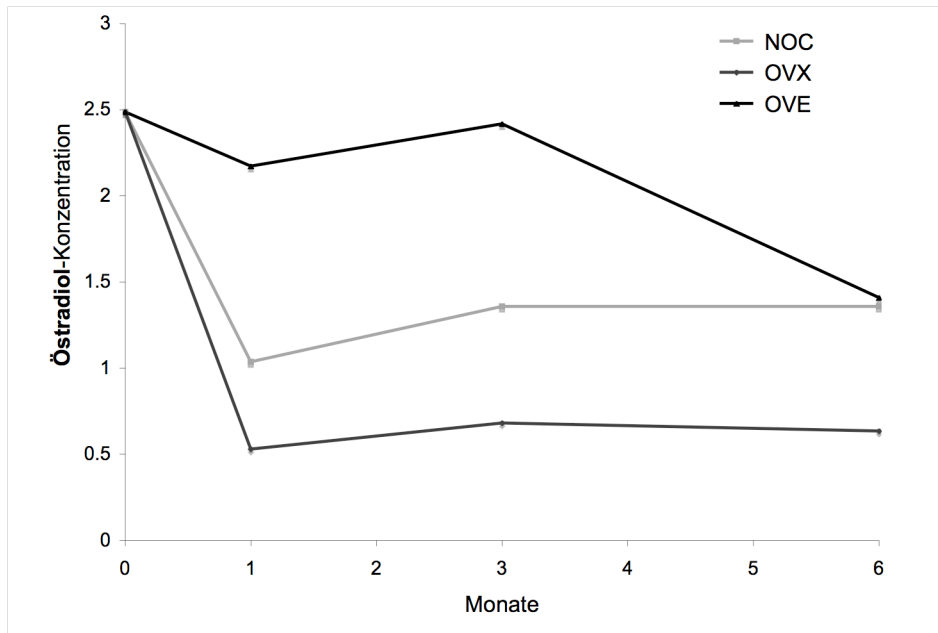


Abb. 11. Östradiolkonzentration (pg/ml) vor der Ovariectomie (0) und nach dem 1., 3. und 6. Monat postoperativ bei den Versuchsgruppen NOC, OVX und OVE.

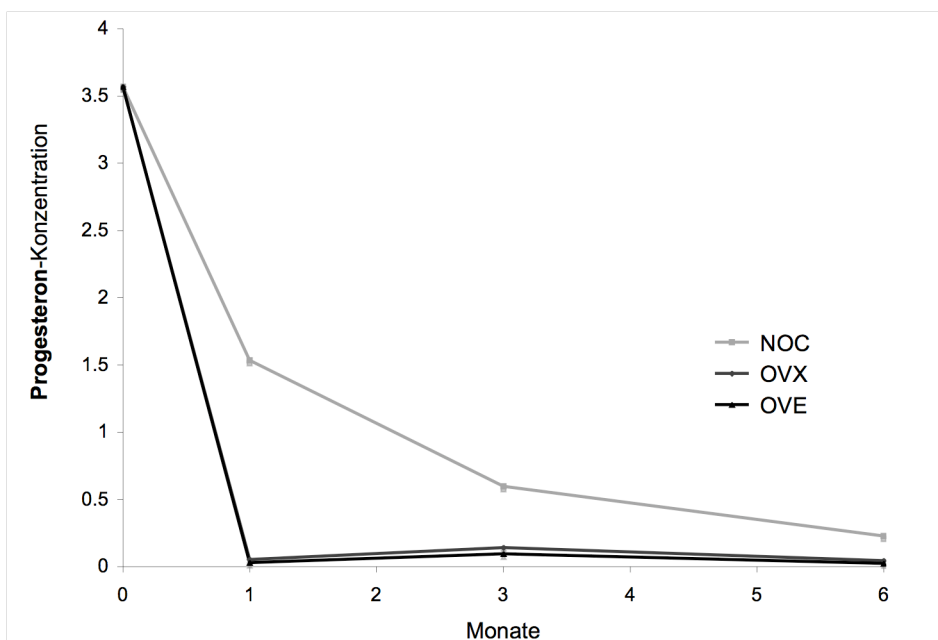


Abb. 12. Progesteronkonzentration (ng/ml) vor der Ovariectomie (0) und nach dem 1., 3. und 6. Monat postoperativ bei den Versuchsgruppen NOC, OVX und OVE.

Tabelle 12. Östradiol- und Progesteronkonzentrationen 1 Monat (t_{1m}), 3 Monate (t_{3m}) sowie 6 Monate (t_{6m}) nach der Ovariectomie bei den Versuchsgruppen NOC, OVX und OVE.

Gruppe	Tier	Östradiol (pg/ml) zum Zeitpunkt t			Progesteron (ng/ml) zum Zeitpunkt t		
		t_{1m}	t_{3m}	t_{6m}	t_{1m}	t_{3m}	t_{6m}
NOC	NOC I	0.84	0.56	0.69	3.27	1.44	0.00
	NOC II	0.90	1.37	1.04	1.86	0.44	0.00
	NOC III	0.44	1.56	1.21	1.17	0.80	0.44
	NOC IV	1.09	1.10	1.13	1.77	0.00	0.42
	NOC V	2.37	0.76	0.76	1.13	0.89	0.50
	NOC VI	0.57	2.79	3.31	0.00	0.00	0.00
	NOC Ø	1.04	1.36	1.36	1.53	0.60	0.23
	± SD	± 0.69	± 0.79	± 0.98	± 1.08	± 0.56	± 0.25
OVX	OVX I	0.66	1.16	0.87	0.00	0.00	0.00
	OVX II	0.53	0.67	0.54	0.00	0.22	0.00
	OVX III	0.59	0.71	0.34	0.00	0.45	0.00
	OVX IV	0.37	0.60	0.33	0.14	0.00	0.00
	OVX V	0.43	0.41	0.99	0.17	0.17	0.26
	OVX VI	0.59	0.54	0.74	0.00	0.00	0.00
	OVX Ø	0.59	0.68	0.64	0.05	0.14	0.04
	± SD	± 0.11	± 0.26	± 0.28	± 0.08	± 0.18	± 0.11
OVE	OVE I	1.33	5.04	0.89	0.00	0.16	0.00
	OVE II	0.83	1.83	1.23	0.00	0.22	0.00
	OVE III	3.39	2.27	1.69	0.00	0.19	0.14
	OVE IV	2.39	2.42	1.21	0.00	0.00	0.00
	OVE V	2.53	1.91	1.94	0.00	0.00	0.00
	OVE VI	1.56	1.03	1.49	0.18	0.00	0.00
	OVE Ø	2.01	2.42	1.41	0.03	0.10	0.02
	± SD	± 0.94	± 1.37	± 0.38	± 0.07	± 0.11	± 0.06

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Im Besonderen danke ich:

Prof. Dr. H. Augsburg für die Betreuung der Dissertation.

PD Dr. I. M. Reichler für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. M. Hässig für die freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Jeanne Peter für ihre kompetente Unterstützung bei der graphischen Arbeit und für die überaus amüsanten Begegnungen.

Jocelyne Leclerc und dem Laborteam für die geduldige Einführung in die Labortechniken.

Silvia Leimbacher für ihre treue Hilfe in Computerfragen und die schöne gemeinsame Zeit in der Anatomie.

Meiner Schwester Bettina Führer und meinem Vater Prof. Dr. Christoph Führer für das sorgfältige und gewissenhafte Lektorat.

Dr. med.vet. Thérèse de Vries für die wunderbare Freundschaft und ihr offenes Ohr für alle Lebensfragen.

Meinen Freunden, denen ich zahlreiche wunderschöne Erlebnisse in diesem Jahr verdanke.

Meinem Freund David Moret für seine Liebe und die grosse Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Lebenslauf

Personalien

Vorname Name	Constanze Führer
Geburtsdatum	15. August 1981
Geburtsort	Leipzig
Nationalität	Schweiz
Heimatort	Stadt Zürich

Ausbildung

1988–1992	Primarschule, Leipzig
1992–1994	Primarschule Hirschengraben, Zürich
1994–1996	Sekundarschule Hirschengraben, Zürich
1996–2001	Kantonsschule Wiedikon
2001	Matura Typ L
2001	Matura Typ D
2001–2006	Studium an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
2003–2004	Veterinärmedizinische Universität Wien
2006–2008	Assistenz und Doktorat am Veterinär-Anatomischen Institut der Vetsuisse- Fakultät der Universität Zürich
2008	Assistenztierärztin in Bäretswil, ZH

Zürich, 6.02.2009